

**SAMANTA LUIZA DE ARAÚJO**

**RATOS WISTAR EXPOSTOS AOS INSETICIDAS LAMBDA-CIALOTRINA,  
CARBARIL E METAMIDOFÓS EM TESTES REPRODUTIVOS  
DE CURTA E LONGA DURAÇÃO**

**Dissertação apresentada como requisito  
parcial à obtenção do grau de Mestre, pelo  
Curso de Pós-Graduação em  
Farmacologia, do Setor de Ciências  
Biológicas da Universidade Federal do  
Paraná.**

**Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto  
Dalsenter**

**CURITIBA**

**2005**

## **DEDICATÓRIA**

**A meus pais, meu filho e aos  
animais que perderam a vida para  
que esta dissertação fosse  
desenvolvida.**

## AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Paulo Roberto Dalsenter** pela orientação, estímulo, amizade e confiança desde os tempos de iniciação científica. Por me ensinar que podemos evitar as quedas dando um passo depois do outro.

Aos professores, funcionários e colegas do **Departamento de Farmacologia** da UFPR.

Aos meus colegas de laboratório **Tony, Stéfani e Diogo** pelo companheirismo e ajuda nas longas horas de trabalho no biotério.

Aos Funcionários do **biotério** do Setor de Ciências Biológicas da UFPR.

Aos funcionários da empresa agrícola **AgroJardins** pelo incentivo e apoio no início do mestrado.

Aos meus pais **Luiz e Vera** por entenderem minha ausência e me darem apoio para continuar com os experimentos mesmo nos dias mais tempestivos.

A minha irmã **Luiza** pela garra mostrada em toda sua vida estudantil e principalmente no mestrado, por ter me mostrado que com força de vontade é possível seguirmos em frente e alcançarmos nossos objetivos.

A grande amiga **Paula** que com força de vontade e bom humor me deu incentivo para continuar sempre, não importando as provas à frente.

Ao **João**, meu companheiro durante todo o período do mestrado sempre me ajudando e me apoiando mesmo nos experimentos aos sábados, domingos e feriados.

Ao meu filho **Caiman** que com apenas um ano foi diariamente para a escola em período integral durante o período do mestrado. Pela perda de fins de semana e feriados ensolarados esperando a realização de experimentos sempre com um sorriso no rosto, palavras de afeto e um grande abraço.

A **CAPES** e a **FUNPAR** pelo apoio financeiro.

## **EPIÍGRAFE**

**“Servir só para si é não servir  
para nada”.**

**Voltaire**

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE SIGLAS.....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....</b>	<b>xii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xiii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xiv</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>03</b>
2.1 SUBSTÂNCIAS INVESTIGADAS.....	03
2.1.1 Lambda-cialotrina.....	03
2.1.2 Metamidofós.....	06
2.1.3 Carbaril.....	07
2.2 DESREGULADORES ENDÓCRINOS.....	08
2.2.1 Mecanismos de ação dos desreguladores endócrinos.....	08
2.2.1.1 Agonistas e antagonistas de hormônios endógenos.....	08
2.2.1.2 Interferência com a síntese e o metabolismo do hormônio endógeno.....	09
2.2.1.3 Interferência com o transporte e a remoção do hormônio natural da circulação.....	10
2.2.1.4 Alterando o efeito após a ligação do hormônio no receptor.....	10
2.2.1.5 Redução na produção de receptores para esteróides.....	11
2.2.2 Potencial desregulador endócrino dos pesticidas estudados.....	11
2.3 TESTES UTILIZADOS PARA CARACTERIZAR DESREGULADORES ENDÓCRINOS.....	12
2.3.1 Teste uterotrófico.....	13
2.3.2 Teste de hershberger.....	13
2.3.3 Protocolo de estudo em ratas púberes.....	13
2.3.4 Protocolos de estudos em ratos púberes.....	14
2.3.5 Protocolo de reprodução em peixes.....	14
2.3.6 Protocolo de metamorfose em sapos.....	14
2.3.7 Teste envolvendo a reprodução do camarão <i>mysid</i> .....	15
2.3.8 Teste reprodutivo em 2 gerações (mamíferos).....	15
2.3.9 Ensaio do gene repórter.....	15
2.3.10 Ensaio de ligação a receptor esteróide.....	15
2.3.11 Ensaio de proliferação celular.....	16
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	17
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17

<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>18</b>
4.1 ANIMAIS.....	18
4.2 ACASALAMENTOS.....	18
4.3 LAVADOS VAGINAIS.....	18
4.4 FÊMEAS COM PREENHEZ POSITIVA.....	18
4.5 EXPOSIÇÃO DOS ANIMAIS.....	19
4.6 DADOS DAS PROGENITORAS.....	20
4.7 AVALIAÇÃO DOS DESCENDENTES.....	21
4.7.1 Desenvolvimento geral.....	21
4.7.1.1 Massa da progênie.....	21
4.7.1.2 Descolamento de pavilhões auriculares.....	21
4.7.1.3 Surgimento de pêlos.....	22
4.7.1.4 Abertura palpebral ocular bilateral.....	22
4.7.2 Desenvolvimento sexual dos machos.....	22
4.7.2.1 Descida dos testículos ao escroto.....	22
4.7.2.2 Separação prepucial.....	22
4.7.3 Desenvolvimento sexual das fêmeas.....	22
4.7.3.1 Abertura do canal vaginal.....	22
4.7.3.2 Primeiro estro.....	22
4.7.3.3 Regularidade do ciclo estral.....	23
4.7.4 Avaliação dos descendentes femininos em idade adulta.....	23
4.7.4.1 Sacrifício.....	23
4.7.4.2 Massa de órgãos.....	23
4.7.5 Avaliação dos descendentes masculinos em idade adulta.....	24
4.7.5.1 Sacrifício.....	24
4.7.5.2 Massa de órgãos.....	24
4.7.5.3 Produção espermática diária, contagem de espermatozoides e tempo de trânsito espermático.....	24
4.8 TESTE UTEROTRÓFICO.....	25
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	26
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>27</b>
5.1 DADOS DAS PROGENITORAS.....	27
5.2 DESENVOLVIMENTO GERAL DA PROGÊNIE.....	29
5.3 DESENVOLVIMENTO SEXUAL DA PROGÊNIE.....	33
5.4 PROGENIE FEMININA EM IDADE ADULTA.....	36
5.5 PROGENIE MASCULINA EM IDADE ADULTA.....	40
5.5.1 Massa corporal e massa relativa de órgãos.....	40
5.5.2 Produção espermática diária, contagem de espermatozoides na cauda do epidídimo e tempo de trânsito espermático.....	41

5.6 TESTE UTEROTRÓFICO.....	42
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>46</b>
6.1 DADOS DA PRENHEZ.....	47
6.2 DADOS DO DESENVOLVIMENTO GERAL DOS DESCENDENTES.....	48
6.3 DADOS DO DESENVOLVIMENTO SEXUAL DOS DESCENDENTES FÊMEAS.....	48
6.4 PROGÊNIE FEMININA EM IDADE ADULTA.....	49
6.5 DESENVOLVIMENTO SEXUAL DOS DESCENDENTES MASCULINO.....	49
6.6 PROGÊNIE MASCULINA EM IDADE ADULTA.....	49
6.7 TESTE UTEROTRÓFICO.....	50
6.8 COMPARAÇÃO DO TESTE DE LONGA COM O DE CURTA DURAÇÃO.....	51
6.9 RISCOS DOS PESTICIDAS.....	51
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>52</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>53</b>

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	FÓRMULA ESTRUTURAL DA LAMBDA-CIALOTRINA.....	04
FIGURA 2 -	FÓRMULA ESTRUTURAL DO METAMIDOFÓS.....	06
FIGURA 3 -	FÓRMULA ESTRUTURAL DO CARBARIL.....	08
FIGURA 4 -	ESQUEMA DEMONSTRANDO O PERÍODO DE EXPOSIÇÃO DOS ANIMAIS.....	20
FIGURA 5 -	MASSA CORPORAL DE RATAS EXPOSTAS A LAMBDA-CIALOTRINA, AO CARBARIL E AO METAMIDOFÓS DURANTE A PRENHEZ E A LACTAÇÃO.....	27
FIGURA 6 -	MASSA RELATIVA DOS ÓRGÃOS DE RATAS EXPOSTAS A LAMBDA-CIALOTRINA, AO CARBARIL E AO METAMIDOFÓS NA PRENHEZ E NA LACTAÇÃO.....	28
FIGURA 7 -	GANHO DE MASSA CORPORAL, MASSA AO NASCIMENTO E MASSA AO DESMAME DA PROGÊNIE EXPOSTA A LAMBDA-CIALOTRINA, AO CARBARIL E AO METAMIDOFÓS <i>IN UTERO</i> E NA LACTAÇÃO.....	30
FIGURA 8 -	DESCOLAMENTO DOS PAVILHÕES AUDITIVOS DA PROGÊNIE EXPOSTA A LAMBDA-CIALOTRINA, AO CARBARIL E AO METAMIDOFÓS <i>IN UTERO</i> E NA LACTAÇÃO.....	31
FIGURA 9 -	ABERTURA DAS PÁLPEBRAS OCULARES DA PROGÊNIE EXPOSTA A LAMBDA-CIALOTRINA, AO CARBARIL E AO METAMIDOFÓS <i>IN UTERO</i> E NA LACTAÇÃO.....	31
FIGURA 10 -	APARECIMENTO DE PÊLOS NA PROGÊNIE EXPOSTA A LAMBDA-CIALOTRINA, AO CARBARIL E AO METAMIDOFÓS <i>IN UTERO</i> E NA LACTAÇÃO.....	32
FIGURA 11 -	DESCIDA DOS TESTÍCULOS AO ESCROTO, OBSERVADA NA PROGÊNIE MASCULINA EXPOSTA A LAMBDA-CIALOTRINA, AO CARBARIL E AO METAMIDOFÓS <i>IN UTERO</i> E NA LACTAÇÃO.....	33
FIGURA 12 -	ABERTURA DO CANAL VAGINAL OBSERVADA NA PROGÊNIE FEMININA EXPOSTA A LAMBDA-CIALOTRINA, AO CARBARIL E AO METAMIDOFÓS <i>IN UTERO</i> E NA LACTAÇÃO.....	34
FIGURA 13 -	SEPARAÇÃO PREPUCIAL OBSERVADA NA PROGÊNIE MASCULINA EXPOSTA A LAMBDA-CIALOTRINA, AO CARBARIL E AO METAMIDOFÓS <i>IN UTERO</i> E NA LACTAÇÃO.....	34
FIGURA 14 -	DETECÇÃO DO PRIMEIRO ESTRO DA PROGÊNIE FEMININA EXPOSTA A LAMBDA-CIALOTRINA, AO CARBARIL E AO METAMIDOFÓS <i>IN UTERO</i> E NA LACTAÇÃO.....	35
FIGURA 15 -	MASSA CORPORAL DA PROGÊNIE FEMININA ADULTA EXPOSTA A LAMBDA-	



	CIALOTRINA, AO CARBARIL E AO METAMIDOFÓS <i>IN UTERO</i> E NA LACTAÇÃO.....	36
FIGURA 16 -	MASSA ABSOLUTA E RELATIVA DO FÍGADO DA PROGÊNIE FEMININA ADULTA EXPOSTA A LAMBDA-CIALOTRINA, AO CARBARIL E AO METAMIDOFÓS <i>IN UTERO</i> E NA LACTAÇÃO.....	37
FIGURA 17 -	MASSA ABSOLUTA E RELATIVA DOS RINS DA PROGÊNIE FEMININA ADULTA EXPOSTA A LAMBDA-CIALOTRINA, AO CARBARIL E AO METAMIDOFÓS <i>IN UTERO</i> E NA LACTAÇÃO.....	38
FIGURA 18 -	MASSA ABSOLUTA E RELATIVA DO ÚTERO DA PROGÊNIE FEMININA ADULTA EXPOSTA A LAMBDA-CIALOTRINA, AO CARBARIL E AO METAMIDOFÓS <i>IN UTERO</i> E NA LACTAÇÃO.....	39
FIGURA 19 -	MASSA CORPORAL DE RATAS IMATURAS EXPOSTAS A LAMBDA-CIALOTRINA, AO CARBARIL E AO METAMIDOFÓS AFERIDA NO SACRIFÍCIO - TESTE UTEROTRÓFICO.....	43
FIGURA 20 -	MASSA ABSOLUTA DO ÚTERO DE RATAS IMATURAS EXPOSTAS A LAMBDA-CIALOTRINA, AO CARBARIL E AO METAMIDOFÓS AFERIDA NO SACRIFÍCIO - TESTE UTEROTRÓFICO.....	44
FIGURA 21 -	MASSA RELATIVA DO ÚTERO DE RATAS IMATURAS EXPOSTAS A LAMBDA-CIALOTRINA, AO CARBARIL E AO METAMIDOFÓS AFERIDA NO SACRIFÍCIO - TESTE UTEROTRÓFICO.....	45

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b>	FASES DO CICLO ESTRAL DE RATAS.....	23
-		
<b>TABELA 2</b>	ÍNDICES REPRODUTIVOS DE RATAS EXPOSTAS A LAMBDA-CIALOTRINA, CARBARIL E METAMIDOFÓS DURANTE A PRENHEZ E A LACTAÇÃO.....	29
-		
<b>TABELA 3</b>	- VARIÁVEIS DO DESENVOLVIMENTO SEXUAL DA PROGÊNIE FEMININA EXPOSTA A LAMBDA-CIALOTRINA, AO CARBARIL E AO METAMIDOFÓS <i>IN UTERO</i> E NA LACTAÇÃO.....	36
<b>TABELA 4</b>	MASSA CORPORAL E MASSA ABSOLUTA DOS ÓRGÃOS DA PROGÊNIE MASCULINA EM IDADE ADULTA, EXPOSTA A LAMBDA-CIALOTRINA, AO CARBARIL E AO METAMIDOFÓS <i>IN UTERO</i> E NA LACTAÇÃO.....	40
-		
<b>TABELA 5</b>	- MASSA CORPORAL E MASSA RELATIVA DOS ÓRGÃOS DA PROGÊNIE MASCULINA EM IDADE ADULTA, EXPOSTA A LAMBDA-CIALOTRINA, AO CARBARIL E AO METAMIDOFÓS <i>IN UTERO</i> E NA LACTAÇÃO.....	41
<b>TABELA 6</b>	- PRODUÇÃO ESPERMÁTICA DIÁRIA, NÚMERO DE ESPERMATOZÓIDES NA CAUDA DO EPIDÍDIMO E TEMPO DE TRÂNSITO ESPERMÁTICO DA PROGÊNIE MASCULINA EXPOSTA A LAMBDA-CIALOTRINA, AO CARBARIL E AO METAMIDOFÓS <i>IN UTERO</i> E NA LACTAÇÃO.....	42

## LISTA DE SIGLAS

<b>AMBLAV</b>	– Associazione Ambiente e Lavoro: Associação do Ambiente e Trabalho
<b>ANVISA</b>	– Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>EDSTAC</b>	– Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee: Comitê Consultivo de Pesquisa e Teste de Desreguladores Endócrinos
<b>FSH</b>	– Follicular Stimulating Hormone: Hormônio Folículo-Estimulante
<b>GnRH</b>	– Gonadotrophin Releasing Hormone: Hormônio Liberador de Gonadotrofinas
<b>IDA</b>	– Ingestão Diária Aceitável
<b>LH</b>	– Lutheinizng Hormone: Hormônio Luteinizante
<b>LOEL</b>	– Lowest Observed Effect Level: Menor Dose Efeitos Observáveis
<b>MCF-7</b>	– Breast Carcinoma Cell Line: Linhagem Celular de Carcinoma Mamário
<b>NOAEL</b>	– No obseved adverse effect level: Dose em que não se observa efeitos adverso
<b>NPTN</b>	– National Pesticide Telecommunications Network: Rede de Telecomunicações Nacional de Pesticidas
<b>OECD</b>	– Organization for Economic Co-operation and Development: Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
<b>PAN-UK</b>	– Pesticide Action Network – UK: Rede de Ação de Pesticidas - Reino Unido
<b>PARA</b>	– Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos
<b>US EPA</b>	– United States Environmental Protection Agency: Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
<b>WHO</b>	– World Health Organization: Agência de Proteção ambiental dos Estados Unidos

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

<b>DL<sub>50</sub></b>	- dose letal 50%
<b>epm</b>	- erro padrão da média
<b>g</b>	- gramas
<b>h</b>	- horas
<b>kg</b>	- quilogramas
<b>mg</b>	- miligramas
<b>mL</b>	- mililitros
<b>μL</b>	- microlitros
<b>n</b>	- tamanho da amostra
<b>nº</b>	- número
<b>p</b>	- nível de significância estatístico
<b>%</b>	- percentual
<b>®</b>	- marca registrada

## RESUMO

A população está exposta aos resíduos de pesticidas através da água e alimentos. Alguns destes pesticidas podem interferir com o sistema endócrino, mimetizando ou inibindo efeitos hormonais. A lambda-cialotrina, o carbaril e o metamidofós são inseticidas suspeitos de interferir com o sistema endócrino, e encontrados em forma de resíduos nos alimentos. Os efeitos deletérios destas substâncias podem ser mais pronunciados nos seres em desenvolvimento (vida intra-uterina e lactente), quando a exposição ocorre através da difusão placentária e do leite materno. Esta pesquisa foi elaborada para verificar se estas substâncias podem interferir no desenvolvimento geral e sexual de animais expostos *in utero* e na lactação. Para tanto, ratas da variedade Wistar (n = 60) foram expostas via oral (gavagem) aos pesticidas isolados (em concentração 100 vezes superiores a ingestão diária aceitável) diariamente a partir do 6º dia de prenhez até 21º dia de lactação. Os pesticidas foram diluídos em água destilada e utilizados nas doses 5,0 mg x kg<sup>-1</sup> (lambda-cialotrina-Fortis®), 0,3 mg x kg<sup>-1</sup> (carbaril-Sevin®480 SE) e 0,4 mg x kg<sup>-1</sup> (metamidofós – Tamaron® BR). A progênie foi acompanhada diariamente para detectar características do desenvolvimento geral e sexual: descolamento de orelhas, abertura de olhos, aparecimento de pelos, descida dos testículos ao escroto, separação prepucial, abertura do canal vaginal, dia do primeiro estro e regularidade do ciclo estral. A progênie foi sacrificada em idade adulta para observar se houve interferência permanente das substâncias em variáveis específicas referentes ao sistema reprodutor masculino e feminino: massa de órgãos (fígado, rins, testículos, epidídimos, próstata, vesículas seminais e útero), produção espermática e número de espermatozoides. Para detectar se as substâncias interagem com o receptor para o hormônio estradiol, ratas desmamadas (21º dia pós-natal), provenientes de mães não expostas, foram expostas aos pesticidas, isolados e misturados, nas mesmas doses do experimento anterior, durante 3 dias. No quarto dia, as ratas foram sacrificadas e foi aferida a massa uterina. As doses testadas não produziram toxicidade materna nem fetal. O único efeito adverso foi o retardo em quase 3 dias para o aparecimento do primeiro estro na progênie feminina exposta aos pesticidas lambda-cialotrina e carbaril, porém não houve alteração na regularidade do ciclo estral. Não foi observado efeito adverso na progênie masculina e feminina em idade adulta. No teste uterotrófico foi detectado efeito estrôgeno no grupo exposto a mistura de pesticidas avaliados através da massa relativa uterina (média ± epm): 0,06 ± 0,003 (controle); 0,13 ± 0,021 (mistura). Para elucidar o mecanismo de ação destas substâncias são necessários outros testes, pois os pesticidas podem interferir com outros hormônios do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas. Neste trabalho concluímos que a ingestão diária aceitável de resíduos de pesticidas, proposta pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, mostrou-se segura para as variáveis avaliadas, quando estes pesticidas foram administrados de forma isolada. Porém, a exposição destes produtos concomitantemente pode induzir efeitos sinérgicos, como demonstrado no teste uterotrófico, reforçando a necessidade de investigações com misturas de pesticidas.

**Palavras-chave:** pesticidas; toxicologia reprodutiva; prenhez; lactação; desreguladores endócrinos; uterotrófico; ação estrogênica.

## ABSTRACT

People are exposed to pesticides residues through water and food. Some of them can interfere with the endocrine system inhibiting or imitating hormones effects. The insecticides lambda-cyhalothrin, carbaryl and methamidophos are endocrine system disruptor suspects. The deleterious effects of these substances are pronounced in developing beings (intra-uterine life and lactating life), this exposition occurs by placenta and maternal milk. This research was made to verify if these substances can interfere with the general and sexual animal development exposed *in utero* and in lactation period. For this, Wistar rats (n = 60) were daily exposed orally to the isolated pesticides (concentration 100 times de accepted daily ingestion - ADI) from the pregnancy day 6 until the weaning. The pesticides were diluted in distilled water: 5.0 mg x kg<sup>-1</sup> (lambda-cyhalothrin – Fortis®), 0.3 mg x kg<sup>-1</sup> (carbaryl – Sevin® 480 SE) and 0.4 mg x kg<sup>-1</sup> (methamidophos – Tamaron® BR). The progeny was daily monitored to detect the development and sexual characteristics: ear separation, fur appearance, testicular migration, prepucial separation, vaginal opening, first day estrous and estrus regularity. The progeny was killed in adulthood to check if the substances interfered with the reproductive system by: organs weight (liver, kidneys, testis, prostate, seminal vesicles and uterus), daily sperm production and sperm number. To detect if the pesticides tested can interfere with the estradiol receptor, female (day 21 after birth) from untreated moms were exposed to the isolated pesticides or to their mixture for three days. The doses were the same described. The female were killed in the day four and their uteri were weighed. The doses tested did not lead to maternal toxicity. The only adverse effect was a three days delay to the first estrous in lambda-cyhalothrin and carbaryl groups. Despite this fact the female had no changes in estrus cycle. The pesticides did not affect the adult progeny. The mixture group shown estrogenic effect in uterotrophic assay when analyzed the uterus relative weight (mean ± standard error): 0.06 ± 0.003 (control); 0.13 ± 0.021 (pesticides mixture). The ADI from the isolated pesticides was safety in these experiments, but we are chronically exposed to pesticides mixture and it can have synergic effect as the mixture group as shown in uterotrophic assay.

**Key-words:** pesticides; reproductive toxicology; pregnancy; lactation; endocrine disruptors; estrogenic action.

## 1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento tecnológico e industrial ocorrido no século XX, após a Segunda Guerra Mundial, levou ao crescimento da produção de pesticidas. A utilização dos pesticidas cresceu com a forma de exploração agrícola e pecuária intensiva a partir de 1960 (ECOBICHON, 1996). O Brasil é um dos maiores consumidores de pesticidas do mundo (CALDAS, 2000).

A utilização de pesticidas melhora a produção animal e vegetal porque elimina parasitas que competem por alimentos ou causam doenças. Porém, os pesticidas também trazem riscos ao meio ambiente e à saúde humana e animal, não só por serem capazes de causar intoxicação aguda, mas por possíveis efeitos crônicos, difíceis de serem relacionados à exposição em baixas concentrações, como no caso de compostos que induzem a carcinogênese ou que levam ao aparecimento de alterações orgânicas observadas apenas no indivíduo púbere e adulto (NEUBERT; CHAHOUD, 1995; COOPER; GOLDMAN; STOKER, 1999).

Os pesticidas estão entre os poluentes químicos que mais causam preocupação devido ao uso em larga escala, erros no manejo do equipamento para a aplicação e falta de respeito aos períodos de carência. Isso torna possível a exposição da população através de resíduos presentes nos alimentos e na água. Os pesticidas não são substâncias seletivas às pragas, e podem causar um desequilíbrio ambiental podendo levar a um aumento ou redução da riqueza e da abundância de espécies em nível trófico inferior.

A função reprodutiva pode ser influenciada por substâncias capazes de atuar no sistema endócrino, interferindo na interação de hormônios naturais com seus receptores, na síntese dos hormônios naturais, ou na remoção dos mesmos da circulação (US. EPA, 1997). Substâncias que interferem com a regulação hormonal do indivíduo são designadas desreguladores endócrinos e podem ocasionar problemas para o desenvolvimento, reprodução e comportamento sexual de animais e seres humanos. Isso, principalmente quando o organismo imaturo é exposto, pois apresenta menor capacidade metabólica e de eliminação de substâncias (SHEETS e cols., 1994; AZIZ e cols, 2001).

No ser humano, os aumentos na incidência de infertilidade, neoplasia testicular e anormalidades estruturais do sistema reprodutivo podem estar relacionados à exposição a pesticidas e outros contaminantes químicos ambientais capazes de interferir no sistema endócrino (COLBORN; VOM-SAAL; SOTO, 1993; JENSEN e cols., 1995). Esta hipótese foi discutida em duas oficinas desenvolvidas pelo escritório de desenvolvimento e pesquisa da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, em 1995 (US EPA, 2000a). A partir dessa data foi criado um plano para rastrear substâncias que possam interferir com o sistema endócrino, através de estudos *in vivo* e *in vitro* (EDSTAC, 1998). Substâncias como os carbamatos, organofosforados e piretróides (PAN-UK, 2001), que são encontradas na fórmula de diversos inseticidas para uso doméstico e nas lavouras, fazem parte das substâncias suspeitas.

O estudo de efeitos biológicos causados por substâncias que potencialmente são desreguladores endócrinos, conduzido pela análise de variáveis reprodutivas, é essencial para o entendimento das conseqüências que são danosas ao meio ambiente, incluindo-se neste a espécie humana. Tais estudos preferencialmente deveriam, amparados pela legislação, preceder a inclusão de um produto tóxico no mercado. O objetivo deste trabalho é verificar possíveis efeitos dos pesticidas lambda-cialotrina, carbaril e metamidofós no desenvolvimento geral e sexual da progênie quando ratas são expostas durante a gestação e lactação.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Em 2001 foi iniciado um Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos (PARA) pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) com publicação anual dos resultados obtidos. Este programa visa o rastreamento de substâncias utilizadas fora do padrão legislativo proposto pela própria ANVISA. No período de junho de 2001 a junho de 2002 foram levantados 91 princípios ativos agroquímicos em nove culturas agrícolas diferentes. O metamidofós foi detectado nas culturas de morango e tomate, culturas em que o uso é proibido; o carbaril foi encontrado nas culturas de alface e batata; e a lambda-cialotrina foi encontrada nas culturas de alface e tomate; ambos acima dos limites máximos de resíduos permitidos (ANVISA, 2003a).

A possibilidade de ingestão ou inalação dos pesticidas por animais domésticos ou seres humanos ocorre através de alimentos contaminados e no momento da aplicação. Esta é uma realidade a ser considerada no Brasil, um país onde a população é carente de instrução, economicamente desfavorecida e, principalmente, desprovida de órgãos fiscalizadores e operacionais que façam cumprir a legislação ambiental.

### 2.1 Substâncias investigadas

#### 2.1.1 LAMBDA-CIALOTRINA

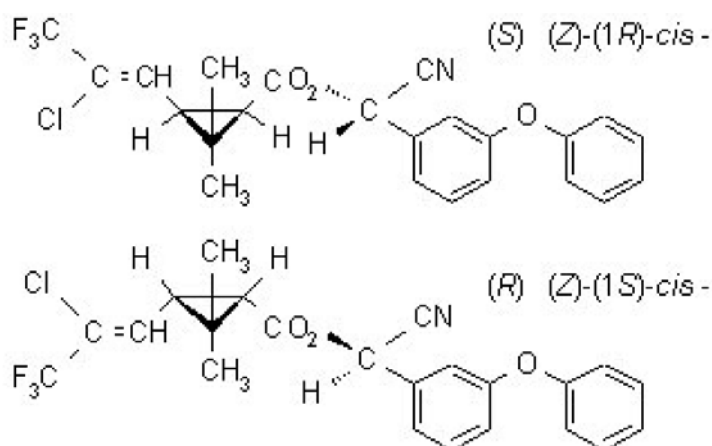
A lambda-cialotrina [alfa-ciano-3-fenoxibenzil-3-(2-cloro-3,3,3-trifluoroprop-1-enil) 2,2-dimetil-ciclopropanocarboxilato] é uma mistura de dois isômeros da cialotrina. É um inseticida piretróide sintético de segunda geração, obtido pela adição de um grupo cianídrico ao carbono alfa do anel benzênico (Figura 1). Essa adição aumenta a atividade inseticida do piretróide.

A lambda-cialotrina apresenta classe toxicológica II segundo a *World Health Organization* - WHO (2002) e classe toxicológica III segundo a ANVISA (2003b), ou seja, de toxicidade média. Foi desenvolvida em 1977 e liberada para uso na Inglaterra em 1988 (CAGE e cols., 1998). É muito utilizada no combate a insetos das lavouras de maçãs, algodão, batata, couve, feijão e tabaco (PIZZAIA JUNIOR, 2003). Uma formulação do produto microencapsulada (Demand<sup>®</sup> e Fortis<sup>®</sup>) é indicada para combater insetos como pulgas e formigas, e aracnídeos como a

aranha-marrom (*Loxocelis* sp.), carrapatos e várias espécies de escorpiões. O produto deve ser três vezes mais concentrado para combater os aracnídeos (SYNGENTA, 2004; HOF; HEIMANN; RÖMBKE, 1995). A formulação em micro cápsulas aumenta a persistência do pesticida no ambiente e, de acordo com a periodicidade das aplicações, favorecerem a exposição crônica de animais e pessoas.

A lambda-cialotrina tem importância relevante no mercado consumidor de Curitiba – PR, sendo muito utilizada no controle populacional da aranha-marrom (*Loxocelis* sp.), a qual representa um problema ambiental e de saúde pública na região: alta densidade peridomiciliar com invasões e ocupações freqüentes ao ambiente domiciliar, ocasionando alta incidência de acidentes loxocélicos em Curitiba e região metropolitana.

FIGURA 1 - FÓRMULA ESTRUTURAL DA LAMBDA-CIALOTRINA



FONTE: ANVISA, 2003b.

A lambda-cialotrina é hidrolizada em pH 9 (NPTN, 2001) e não sofre hidrólise do pH 5 até o 7. Seu mecanismo de ação é através da interação com a subunidade alfa do canal de sódio nos neurônios. Essa interação leva ao retardo no fechamento dos canais de sódio e hiperexcitação de todo o sistema nervoso do inseto (CAGE e cols., 1998).

Resíduos da lambda-cialotrina podem ser encontrados em produtos ricos em gordura, como o leite e o óleo de oliva. Isso ocorre porque a lambda-cialotrina é uma substância lipossolúvel (DI MUCCIO e cols., 1997; 1999).

A lambda-cialotrina pode sofrer bioacumulação em peixes, armazenada na gordura, podendo trazer risco de intoxicação para níveis superiores da cadeia trófica (NPTN, 2001).

Dezenove a 57% da cipermetrina (outro piretróide de segunda geração) é absorvida quando ingerida por humanos (WOOLLEN e cols., 1991; 1992; NPTN, 2001). O metabolismo da cipermetrina e da lambda-cialotrina é hepático, através de enzimas do complexo citocromo P450. O composto sofre hidrólise do grupo éster, hidroxilação e conjugação com o ácido carboxílico. A principal via de excreção é a renal.

Os sinais de toxicidade pela lambda-cialotrina em mamíferos incluem náuseas, dor de cabeça, tontura, vômito, dor abdominal, ulcera gástrica, convulsão, edema pulmonar, pneumonia química, coma, falha renal, fadiga, salivação e leucocitose (CAGE e cols., 1998).

De acordo com a WHO (2002), a *Associazione Ambiente e Lavoro* - AMBLAV (2000) e a *National Pesticide Telecommunications Network* - NPTN (2001) a dose letal para 50% de uma amostra ( $DL_{50}$ ) de ratos expostos pela via oral ao inseticida lambda-cialotrina é de  $79 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$  para machos e de  $56 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$  para fêmeas. Pela via cutânea é de  $632 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$  para machos e  $696 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$  para fêmeas. As doses variam conforme a proporção de isômeros na formulação, sendo os *trans* mais tóxicos. A ingestão diária aceitável (IDA) de resíduos da lambda-cialotrina é de  $0,05 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$  (ANVISA, 2003b).

Não existe o registro de efeitos tóxicos da lambda-cialotrina ou da cialotrina na população geral em exposição aguda ou crônica. A exposição ocupacional de agropecuaristas ou de pessoal envolvido na manufatura de produtos contendo lambda-cialotrina pode levar ao aparecimento de sintomas clínicos algumas horas após a pessoa entrar em contato com a lambda-cialotrina. Os sintomas são de dor de cabeça, rubor facial, dormência na face e língua e tonturas (EHC, 1999).

Metabólitos da lambda-cialotrina foram encontrados no sangue de 45 indivíduos de diferentes idades, doadores de sangue, através de cromatografia gasosa (RAMESH; RAVI, 2004). ANGERER e RITTER (1997) utilizaram a cromatografia gasosa e cromatografia de fase sólida para pesquisar metabólitos da

lambda-cialotrina. Os metabólitos foram encontrados na urina de oito trabalhadores que utilizavam a lambda-cialotrina no combate a insetos.

ÇELIK e cols. (2003) observaram genotoxicidade nas células da medula óssea de ratos albinos expostos a lambda-cialotrina pela via parenteral durante 13 dias a intervalos de 48 horas.

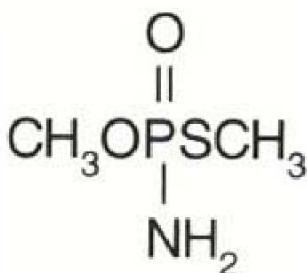
A lambda-cialotrina é facilmente adquirida em muitas de suas formulações (Icon<sup>®</sup>, Demand<sup>®</sup> e Fortis<sup>®</sup>) sem que seja necessária a emissão de receita autorizada por um agrônomo responsável. Em muitos casos, no momento da aquisição, não se fornece informação suficiente sobre o modo de utilização segura do produto.

Suas características de solubilidade facilitam a excreção da substância pelo leite e a passagem pela barreira placentária, favorecendo a exposição ao pesticida no período perinatal. Assim a exposição do neonato ao inseticida, em concentrações que não revelam sinais clínicos de intoxicação sistêmica materna, pode causar danos no indivíduo em desenvolvimento.

### 2.1.2 METAMIDOFÓS

O metamidofós (O,S-dimetil fosforamidotioato) é um inseticida organofosforado do tipo fosfortioamidato (Figura 2) de classe toxicológica Ib segundo a WHO (2002) e classe toxicológica I segundo a ANVISA (2003b), ou seja é altamente tóxico. É muito utilizado no combate a pragas das lavouras de algodão, amendoim, batata, feijão, soja, tomate rasteiro e trigo (ANVISA, 2003b). A DL<sub>50</sub> observada em ratos expostos pela via oral é de 15,6 mg x kg<sup>-1</sup> para machos e de 13 mg x kg<sup>-1</sup> para fêmeas (US EPA, 2000b).

FIGURA 2 - FÓRMULA ESTRUTURAL DO METAMIDOFÓS



FONTE: ANVISA, 2003b.

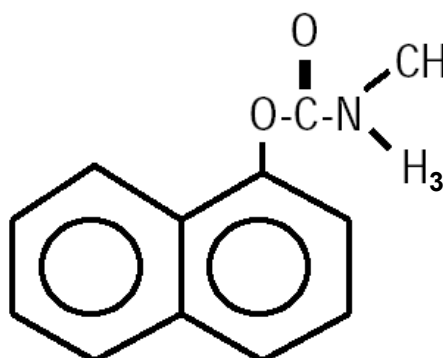
Os organofosforados foram desenvolvidos em 1930, na Alemanha. A ação tóxica de grande parte deles, incluindo o metamidofós, é baseada na inibição da enzima acetilcolinesterase, outras enzimas também são inibidas e incrementam a ação tóxica do pesticida. A inibição ocorre por ligação covalente ao sítio esterásico da enzima e é estabilizada pela formação de ânion superóxido decorrente da reação. Os sinais de intoxicação aguda estão associados à inibição da colinesterase, ou seja, efeitos colinérgicos exacerbados como salivação, diarreia, bradicardia, fasciculação, convulsões, coma e morte. A toxicidade crônica é relacionada a efeitos neurotóxicos (WOODS, 1999). A IDA de resíduos de metamidofós é de  $0,004 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$  (ANVISA, 2003b).

### 2.1.3 CARBARIL

O carbaril (1-naftil N-metilcarbamato) é um inseticida metilcarbamato de naftila (Figura 3) de classe toxicológica II (ANVISA, 2003b; WHO, 2002), ou moderadamente tóxico. É utilizado no combate a pragas das lavouras de abacaxi, abóbora, alho, banana, batata, cebola, couve-flor, feijão, maçã, pastagens, pepino, repolho e tomate. Outros empregos dos carbamatos são: domiciliar e no combate a insetos e aracnídeos em animais.

A ação tóxica do carbaril decorre da inibição da enzima acetilcolinesterase. Os sinais de intoxicação aguda são os mesmos observados com o metamidofós. O carbaril também age inibindo outras enzimas como a desidrogenase láctica e as serinas esterases (COX, 1993). A IDA de resíduos de carbaril é de  $0,003 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$  (ANVISA, 2003b) e a  $DL_{50}$  do carbaril é de  $255 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$  (PFS, 2004).

FIGURA 3 - FÓRMULA ESTRUTURAL DO CARBARIL



FONTE: ANVISA, 2003b.

## 2.2 Desreguladores endócrinos

Desreguladores endócrinos são químicos sintéticos ou naturais com capacidade de interferir com o funcionamento do sistema endócrino, causando alterações no desenvolvimento, comportamento e reprodução de populações humanas e animais. A *National Academy of Science* (NAS, 1999) publicou dados de revisão bibliográfica atribuindo a desreguladores endócrinos as seguintes alterações: decréscimo na qualidade do sêmen humano nos últimos 50 anos, alterações na genitália de animais selvagens, aberrações no comportamento de acasalamento e esterilidade. Este tipo de correlação é difícil, pois geralmente as exposições ocorrem em baixas concentrações e por longos períodos. O mecanismo utilizado por esses químicos também é de difícil demonstração, pois podem atuar em várias etapas da regulação hormonal.

### 2.2.1 MECANISMOS DE AÇÃO DOS DESREGULADORES ENDÓCRINOS

#### 2.2.1.1 Agonistas e antagonistas de hormônios endógenos

Os desreguladores endócrinos podem atuar como antagonistas efetivos de um hormônio, ligando-se a um sítio de ação e impedindo a ligação do hormônio natural, ou como agonistas, onde a ligação do desregulador endócrino a um sítio específico desencadeia a mesma ação que ocorreria com a ligação do hormônio natural.

O mecanismo de ação de antagonistas do hormônio estradiol é através da interação da substância com o receptor, impedindo a transcrição gênica. Este é o caso de um dos mais potentes antagonistas puros do estradiol. O EM-652 se liga ao receptor para o hormônio estradiol e impede a ligação do hormônio natural ao receptor, consequentemente inibe a transcrição do DNA (LABRIE e cols., 1999).

O mecanismo de ação de agonistas do receptor para o hormônio estradiol foi demonstrado para certos piretróides, como a sumetrina, o fenvalerato e a aletrina através de testes *in vitro* utilizando linhagens de células de carcinoma mamário humano (MCF-7) para a indução do gene pS2 que é sensível a estrógenos (GO e cols., 1999). O piretróide se liga ao receptor para o hormônio estradiol e estimula a proliferação celular.

Algumas substâncias podem atuar como agonistas e antagonistas dependendo da dose fornecida e do teste utilizado. Esse é o caso do tamoxifeno no útero de ratas, que em baixas doses tem ação estrogênica e em altas tem ação antiestrogênica (JENSEN; KHAN, 2004). Substâncias que tem esta dupla aptidão são ditas antiestrogênicas do tipo I. Apresentam baixa afinidade pelo sítio de ação do estradiol e alta afinidade por uma fração secundária do receptor que não é reconhecida pelo hormônio estradiol (JORDAN; MURPH, 1990).

Os testes que caracterizam uma substância como agonista ou antagonista são: Uterotrófico, Hershberger, cultivo de células MCF-7 e gene repórter (EDSTAC, 1998; WITORSCH, 2002)<sup>1</sup>.

#### 2.2.1.2 Interferência com a síntese e o metabolismo do hormônio endógeno

A masculinização do sistema nervoso central em machos é dependente da conversão do hormônio testosterona em hormônio estradiol por enzimas do complexo aromatase (MACLUSKY; NAFTOLIN, 1981). A inibição dessa enzima acarreta em masculinização incompleta do sistema nervoso central de ratos machos (PEREIRA, 2003). A aromatase pode ser inibida, por exemplo, pelo antifúngico fenarimol (HIRSCH e col., 1987).

O metabolismo do hormônio natural pode ser aumentado quando o organismo é exposto a indutores enzimáticos, como é o caso da exposição a vapores de

---

<sup>1</sup> Para a descrição dos testes, ver as Referências Bibliográficas, item 2.3, p. 11-15.

gasolina sem chumbo. A gasolina sem chumbo induz enzimas responsáveis pelo metabolismo do estradiol, aumentando a eliminação do hormônio (STANDEVEN; BLAZER; GOLDSWORTHY, 1994). A resultante dessa interferência é um efeito antiestrogênico indireto da substância que não é identificado nos testes de (anti)estrogenicidade *in vitro* mencionados no item anterior. Este tipo de interferência pode ser desvendado utilizando-se testes *in vitro* como o cultivo de células de hepatócitos<sup>1</sup>. Substâncias que causam hepatotoxicidade levarão a redução no metabolismo dos hormônios esteróides.

#### 2.2.1.3 Interferência com o transporte e a remoção do hormônio natural da circulação

Os hormônios lipossolúveis, como o estradiol, a testosterona, a triiodotironina e a tiroxina, são transportados pela circulação sanguínea por carreadores protéicos especializados, sintetizados pelo fígado. O estradiol aumenta a concentração plasmática de globulina ligante de estrógenos e testosterona, enquanto andrógenos e doses terapêuticas de glicocorticóides reduzem a concentração dessa proteína (INGBAR; WOEBER, 1974). A menor concentração do carreador protéico leva ao aumento na concentração de estradiol livre para atuar no organismo.

#### 2.2.1.4 Alterando o efeito após a ligação do hormônio no receptor

Hormônios não esteróides que interagem com receptores acoplados a proteína G dependem de um segundo mensageiro que dará início a uma série de reações bioquímicas fosforilativas. Essas reações somam-se para o efeito celular final. O lindano é um pesticida organoclorado que reduz a formação de fosfatidilinositol na membrana celular, e com isso reduz a ativação da proteína quinase C. A exposição ao lindano leva a falta de contração da musculatura lisa necessária para a liberação de gonadotrofinas, efeito celular final decorrente da ligação do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) ao seu receptor (US EPA, 1997).



#### 2.2.1.5 Redução na produção de receptores para esteróides

A dioxina 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) é um tóxico policlorado de alta persistência no ambiente. Atua reduzindo a expressão do receptor para o hormônio estradiol de maneira indireta, através da ativação do receptor hidrocarboneto de arila. O receptor hidrocarboneto de arila é um ativador da transcrição gênica e quando ativado inibe a síntese de novos receptores para o hormônio estradiol (US EPA, 1997; OENGA; SPINK; CARPENTER, 2004).

#### 2.2.2 POTENCIAL DESREGULADOR ENDÓCRINO DOS PESTICIDAS ESTUDADOS

A lambda-cialotrina, o metamidofós e o carbaril são indicados como possíveis desreguladores endócrinos pela PAN-UK (2001), por RATNASOORIYA, RATNAYAKE e JAYATUNGA (2002), por GÖETTLICH (2003), por CASTRO, CHIORATO e PINTO (2000) e por BURRUEL e cols. (2000).

RATNASOORIYA, RATNAYAKE e JAYATUNGA (2002) expuseram ratos adultos e sexualmente experientes, a 63 e 100 mg x kg<sup>-1</sup> de um produto com 10% de lambda-cialotrina em sua formulação (ICON® - laboratório Syngenta) durante 7 dias por gavagem gástrica. Os animais apresentaram disfunção sexual com redução no número de montas, intromissões e ejaculações.

MONIZ e cols. (1999) demonstraram que a exposição de ratas ao piretróide sintético fenvalerato (10 mg x kg<sup>-1</sup> x dia<sup>-1</sup> pela via intraperitoneal), no 18º dia de gestação e do primeiro ao quinto dia de lactação, foi capaz de reduzir significativamente a concentração plasmática de testosterona e a massa da vesícula seminal nos descendentes masculinos adultos. Foram observadas alterações no comportamento sexual desses animais, com o aumento no número de intromissões e redução no número de ejaculações.

O metamidofós não é encontrado em listas de organizações mundiais como desregulador endócrino. Mas artigos como o de CASTRO, CHIORATO e PINTO (2000) e o de BURRUEL e cols. (2000) correlacionam o metamidofós com atraso no desenvolvimento de ratos e problemas de fertilidade em camundongos, respectivamente.

O carbaril foi considerado teratogênico nas doses de 100, 150 e 200 mg x kg<sup>-1</sup> por MATHUR e BHATNAGAR (1991). Os pesquisadores também observaram baixo peso da progênie ao nascimento e alto índice de reabsorções.

Os piretróides, os organofosforados e os carbamatos são inseticidas lipofílicos amplamente utilizados no combate a pragas de animais e plantas. A exposição a eles se dá pelos alimentos na forma de resíduos, através de absorção cutânea e através da inalação. Poucos testes validados pela EPA foram utilizados para tentar provar a propriedade desses pesticidas como desreguladores endócrinos.

### **2.3 Testes utilizados para caracterizar desreguladores endócrinos**

Uma substância só pode ser considerada desregulador endócrino após passar por vários testes. Em uma primeira fase a substância deve ser considerada suspeita de interferir com o sistema endócrino (endócrinos ativos), para isso são realizadas pesquisas bibliográficas que levam em consideração os possíveis mecanismos de interferência nos sistemas hormonais dos estrógenos, andrógenos e tireoidianos, como previsto em *Tier 1 Screening* (US EPA, 2000a). Em uma segunda fase são realizados testes que permitam identificar se a substância com ação endócrina positiva na primeira fase produz efeitos adversos, como previsto em *Tier 2 Testing* (US EPA, 2000a). Os efeitos adversos devem ser identificados e deve ser estabelecida a correlação entre a concentração utilizada do químico e o aparecimento dos efeitos (curva dose-resposta). A resposta negativa na segunda fase elimina a suspeita sobre o químico.

Os testes utilizados na segunda fase são padronizados e validados em diversos laboratórios para confirmar se são efetivos e passíveis de repetição nos diferentes laboratórios. Os primeiros testes realizados visam à caracterização química do princípio suspeito. Após, são realizados estudos *in vivo* e *in vitro* para determinar o possível efeito do desregulador, a dose necessária para desencadear o efeito, o mecanismo de ação desregulador endócrino da substância e por fim, estudos epidemiológicos são realizados para associar o local contaminado com a

exposição ao químico desregulador endócrino (US EPA, 1998). Nessa revisão damos enfoque apenas aos estudos biológicos realizados *in vivo* e *in vitro*.

### 2.3.1 TESTE UTEROTRÓFICO

O teste uterotrófico é um ensaio *in vivo* de curta duração utilizado na triagem de substâncias com atividade estrogênica ou antiestrogênica, recomendado pelo comitê consultivo de teste e triagem de substâncias desreguladoras endócrinas da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EDSTAC, 1998). O crescimento uterino em ratas imaturas é utilizado como indicador da ação estrogênica de uma substância, enquanto o bloqueio do efeito uterotrófico do estradiol é utilizado como indicador de antiestrogenicidade (ODUM e cols., 1997; ASHBY e cols., 1997; KANG e cols., 2000).

### 2.3.2 TESTE DE HERSHBERGER

O teste de Hershberger (HERSHBERGER; SHIPLEY; MEYER, 1953) é um ensaio *in vivo* de curta duração utilizado na triagem de substâncias que apresentam atividade androgênica ou antiandrogênica, recomendado pelo EDSTAC (1998). Para a realização deste teste são utilizados ratos pré-puberes machos castrados. O efeito androgênico é indicado pelo aumento da massa de órgãos responsivos a andrógenos (próstata e vesículas seminais) frente ao estímulo anabólico do hormônio testosterona. O efeito antiandrôgenico é caracterizado pelo não aumento na massa do órgão na presença do hormônio testosterona.

### 2.3.3 PROTOCOLO DE ESTUDO EM RATAS PÚBERES

O protocolo de puberdade em fêmeas envolve a exposição de ratas imaturas até atingirem a puberdade (do 21º dia até o 42º dia pós-natal). Esse protocolo permite o rastreamento de substâncias que apresentem estrogenicidade e atividade na tireóide (GRAY e cols., 2002; MARTY; CRISSMAN; CARNEY, 1999). Nesse protocolo são avaliadas as massas de órgãos sexuais femininos (útero e ovários), o

aparecimento de características sexuais secundárias (abertura do canal vaginal e ciclo estral) e são dosados hormônios tireoidianos.

#### 2.3.4 PROTOCOLOS DE ESTUDOS EM RATOS PÚBERES

O protocolo de puberdade em machos envolve a exposição de ratos imaturos até atingirem a puberdade (do 21º até o 70º dia pós-natal). Esse protocolo objetiva a detecção de químicos com atividade androgênica ou antiandrogênica em um único teste (GRAY e cols., 2002; MARTY; CRISSMAN; CARNEY, 2001). Nesse protocolo são estudadas anormalidades no desenvolvimento de órgãos sexuais (testículos, epidídimos, próstata e vesículas seminais) e em características secundárias do desenvolvimento sexual (descida dos testículos ao escroto e separação prepucial).

#### 2.3.5 PROTOCOLO DE REPRODUÇÃO EM PEIXES

O protocolo de reprodução em peixes é utilizado para rastrear substâncias com potencial estrogênico e androgênico (JIMÈNEZ, 1997). Nesse protocolo são observadas anormalidades associadas com a sobrevivência dos animais, comportamento reprodutivo, características sexuais secundárias e fecundidade (número de desovas, número de ovos por desova, fertilidade e desenvolvimento da progênie).

#### 2.3.6 PROTOCOLO DE METAMORFOSE EM SAPOS

O protocolo de metamorfose em sapos é utilizado para rastrear substâncias que interferem com hormônio tireoidianos. O processo de metamorfose encontra-se sob o controle da tireóide e pode ser extrapolado para interferências de substâncias na tireóide humana (MACIOROWSKI, 1999). Nesse protocolo são observadas anormalidades na reabsorção da cauda.

### 2.3.7 TESTE ENVOLVENDO A REPRODUÇÃO DO CAMARÃO *MYSID*

O teste reprodutivo com o camarão *Mysid* é utilizado para caracterizar o desregulador endócrino quanto à dose-resposta e efeitos na reprodução e no desenvolvimento de invertebrados (GHEKIERE e cols., 2004).

### 2.3.8 TESTE REPRODUTIVO EM DUAS GERAÇÕES (MAMÍFEROS)

No protocolo reprodutivo em duas gerações expõem-se animais machos e fêmeas ao possível desregulador endócrino por um período antes do acasalamento, durante o acasalamento e durante a prenhez e a lactação (geração F0). A progênie exposta *in utero* e na lactação (geração F1) passa a receber a substância até a puberdade. Os animais da geração F1 púberes são acasalados e expostos durante o período de prenhez e lactação. A progênie F2 é avaliada até a puberdade. São observadas variáveis do desenvolvimento geral e sexual das progênies F1 e F2, de fertilidade das progênies F0 e F1 e avaliações patológicas nas gerações F0, F1 e F2 (US EPA, 2000a; SCHNEIDER e cols. 2005).

### 2.3.9 ENSAIO DO GENE REPORTER

Através do ensaio *in vitro* do gene repórter é possível identificar substâncias que induzam ou inibam a transcrição do gene para uma enzima através do receptor para hormônios esteróides. Para realizar esse ensaio são utilizadas células de cultivo (MCF-7) transfectadas com um plasmídio formado por um elemento responsivo ao hormônio esteróide e um gene para uma enzima (luciferase ou  $\beta$ -galactosidase). A presença ou não de síntese protéica é observada pela reação de cor da enzima produzida com o substrato dessa enzima. Esse ensaio detecta agonistas e antagonistas do receptor esteróide, e substâncias que interfiram na síntese da proteína após a transcrição gênica (HARADA; HONDA, 2005).

### 2.3.10 ENSAIO DE LIGAÇÃO A RECEPTOR ESTERÓIDE

O ensaio é realizado para detectar se há afinidade de uma substância no receptor para o hormônio esteróide feminino ou para o masculino. A substância deve ser marcada por um isótopo radioativo. Esse ensaio detecta se a substância é capaz

de ligar-se ao receptor, porém não permite diferenciar a substância em agonista e antagonista (SOTO e cols., 1995; US EPA, 2000a).

#### 2.3.11 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

O ensaio de proliferação celular é baseado no estímulo proliferativo de substâncias estrogênicas *in vitro*. A substância pesquisada é introduzida em culturas de células que respondem ao estímulo proliferativo do hormônio estradiol (MCF-7) e se observa a resposta celular frente ao estradiol e na sua ausência. Esses estudos detectam substâncias com características estrogênicas e antiestrogênicas (SOTO e cols., 1995; GO e cols., 1999).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivos gerais**

O objetivo geral desse estudo foi avaliar se a exposição *in utero* e na lactação aos inseticidas lambda-cialotrina, metamidofós e carbaril causa interferência com o desenvolvimento geral e sexual de ratos Wistar até a puberdade e no sistema reprodutivo destes ratos em idade adulta.

#### **3.2 Objetivos específicos**

Avaliar possíveis influências dos três pesticidas sobre a prenhez.

Avaliar o desenvolvimento geral e sexual das progênes feminina e masculina, expostas *in utero* e na lactação.

Investigar variáveis que indiquem toxicidade ou alteração em órgãos que respondem a estímulos hormonais na progênie feminina e masculina em idade adulta.

Investigar a ação antiestrogênica ou estrogênica dos pesticidas isolados e misturados através do teste uterotrófico.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Animais**

Para o experimento foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus* var. Wistar). Os animais foram mantidos em salas com temperatura constante ( $20 \pm 2^\circ \text{C}$ ) e ciclo claro/escuro de 12 horas no biotério do Setor de Ciências Biológicas, Centro Politécnico, Universidade Federal do Paraná. Os animais receberam ração (Nuvilab CR-1, Nuvital, Colombo-PR) e água, ambos *ad libitum*.

### **4.2 Acasalamentos**

Ratas Wistar (N = 60) foram acasaladas com ratos machos adultos na proporção de três fêmeas para um macho durante a fase escura do ciclo. Foram realizados lavados vaginais diários na manhã seguinte ao acasalamento para a verificação de espermatozóides. A presença de espermatozóide no lavado vaginal foi considerada como dia um de prenhez. As fêmeas que não apresentaram espermatozóides no lavado vaginal foram novamente acasaladas até que cada grupo experimental fosse composto por pelo menos 15 animais.

### **4.3 Lavados vaginais**

Micropipetas com capacidade para 50 microlitros ( $\mu\text{L}$ ) foram utilizadas para obtenção dos lavados vaginais. As ratas foram contidas e a ponteira (capacidade para  $100 \mu\text{L}$ ) foi introduzida no canal vaginal. Cerca de  $20 \mu\text{L}$  de solução de cloreto de sódio 0,9% foi aplicado no canal vaginal e recolhido com a ponteira. O lavado foi distendido em uma lâmina para microscopia de luz e observado a fresco em aumento de 200 vezes. Os lavados vaginais foram realizados entre sete e oito horas (h) da manhã.

### **4.4 Fêmeas com prenhez positiva**

As ratas que apresentaram espermatozóides no lavado vaginal foram mantidas em caixas coletivas (quatro animais por caixa) de polipropileno ( $414 \times 344 \times 168 \text{ mm}$ ) até o 18º dia de prenhez, quando foram separadas e mantidas individualmente até o parto. A ocorrência de partos foi observada duas vezes ao dia (início da manhã e final da tarde). O dia do parto foi considerado o dia zero (0) pós-natal e os filhotes foram desmamados no 21º dia pós-natal.

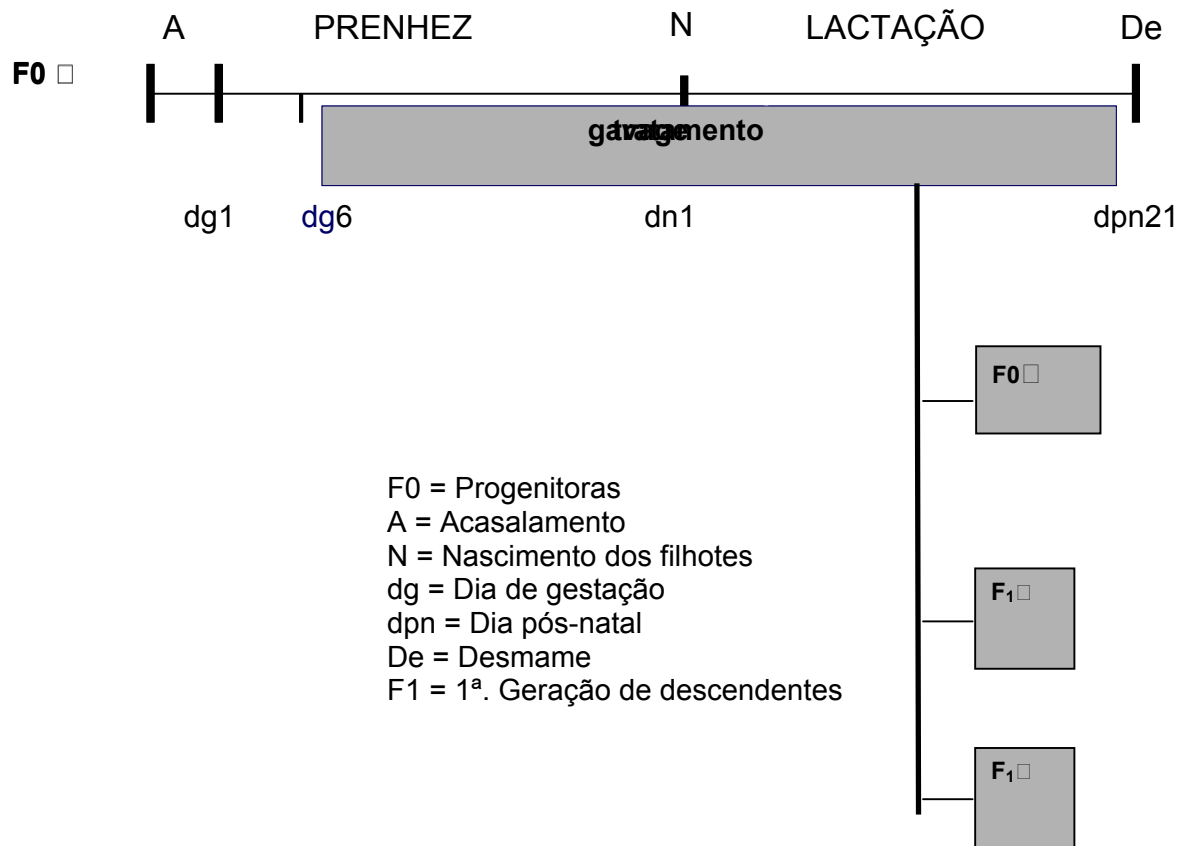


#### 4.5 Exposição dos animais

As fêmeas que apresentaram espermatozóides no lavado vaginal foram distribuídas em quatro grupos. Um grupo (n = 14) foi exposto a água destilada para servir de controle, um grupo (n = 12) foi exposto a lambda-cialotrina na dose de 5,0 mg x kg<sup>-1</sup> (Fortis<sup>®</sup>), um grupo (n = 13) foi exposto ao carbamato na dose de 0,3 mg x kg<sup>-1</sup> (Sevin<sup>®</sup>) e um grupo (n = 13) foi exposto ao metamidofós na dose de 0,4 mg x kg<sup>-1</sup> (Tamaron<sup>®</sup>). As doses utilizadas foram baseadas na IDA recomendada pela ANVISA (2003b) e no trabalho da WHO (1974), sendo que estas doses foram multiplicadas por um fator de segurança (100 vezes) superior a IDA aceita pela ANVISA (2003a). O fator de segurança de 1000 vezes é utilizado para fins de extrapolação do rato para o humano quando não se tem informações precisas sobre a dose que não causa sinais de toxicidade (NOAEL), como a dose 1000 vezes acima da IDA é muito próxima a DL<sub>50</sub> dos produtos avaliados, foi utilizado um fator de segurança de 100 vezes (US EPA, 2005).

As substâncias foram dissolvidas em água destilada e o pH foi aferido para assegurar que não houve degradação das substâncias. A exposição foi através de gavagem diária na dose de 5,0 mL x kg<sup>-1</sup>, iniciada a partir do sexto dia de prenhez, após a fase de implante dos embriões e finalizada no 21º dia de lactação, quando os filhotes foram desmamados (Figura 4).

FIGURA 4 – ESQUEMA DEMONSTRANDO O PERÍODO DE EXPOSIÇÃO DOS ANIMAIS



#### 4.6 Dados das progenitoras

As progenitoras tiveram a massa corporal aferida diariamente durante a prenhez e a lactação. Após a gavagem as progenitoras foram observadas durante dois minutos para detectar indícios de toxicidade, como salivação, diarreia, tremor, convulsões, perda de pelos, pelos opacos e pelos arrepiados. As progenitoras foram sacrificadas por decapitação no 21º dia de lactação. Foram pesados os órgãos: rins, fígado e baço. O útero foi removido para a contagem de pontos de implantes uterinos<sup>2</sup>. Com esses dados foram determinados: perdas pós-implantação, razão sexual e índices de parto, nascimento e desmame (US EPA, 1996) conforme as seguintes fórmulas:

- $$\text{PERDAS PÓS-IMPLANTE} = (\text{n}^\circ \text{ de implantes} - \text{n}^\circ \text{ de nativos}) \times \text{n}^\circ \text{ de implantes}^{-1} \times 100.$$
- $$\text{RAZÃO SEXUAL} = \text{n}^\circ \text{ de filhotes machos} \times \text{n}^\circ \text{ de filhotes fêmeas}^{-1}.$$

- c) ÍNDICE DE PARTO =  $n^{\circ}$  de fêmeas que pariram x  $n^{\circ}$  de fêmeas com espermatozóides no esfregaço vaginal<sup>-1</sup> x 100
- d) ÍNDICE DE NASCIMENTO =  $n^{\circ}$  de nativos x  $n^{\circ}$  de filhotes nascidos<sup>-1</sup> x 100.
- e) ÍNDICE DE VIABILIDADE =  $n^{\circ}$  de filhotes vivos no quarto dia pós-natal x  $n^{\circ}$  de nativos<sup>-1</sup> x 100.
- f) ÍNDICE DE DESMAME =  $n^{\circ}$  de filhotes vivos no desmame x  $n^{\circ}$  de nativos<sup>-1</sup> x 100.

## 4.7 Avaliação dos descendentes

### 4.7.1 DESENVOLVIMENTO GERAL

Foi determinado para a progênie masculina e feminina: massa ao nascer e ao desmame, dia do descolamento de pavilhões auriculares (bilateral), dia do surgimento de pelos e dia da abertura palpebral (bilateral). Os descendentes foram observados por dois minutos diários durante o período de exposição das progenitoras para averiguar sinais de intoxicação, como salivação, diarreia, tremor, convulsões, perda de pelos, pelos opacos e pelos arrepiados. Para a observação destas variáveis não se levou em consideração a diferenciação sexual.

#### 4.7.1.1 Massa da progênie

A progênie foi pesada semanalmente até o 42º dia pós-natal. A primeira aferição da massa corporal, realizada na observação do parto, foi considerada massa ao nascimento. A aferição da massa corporal no 21º dia pós-natal foi considerada massa ao desmame e antecedeu a imediata retirada das progenitoras.

#### 4.7.1.2 Descolamento de pavilhões auriculares

A progênie foi observada imediatamente após o nascimento quanto ao descolamento bilateral completo dos pavilhões auriculares. As observações foram realizadas diariamente até a detecção da variável.

---

<sup>2</sup> Pontos escurecidos no epitélio uterino onde foi inserida a placenta.

#### 4.7.1.3 Surgimento de pêlos

A progênie foi observada a partir do sexto dia pós-natal quanto ao surgimento de pêlos. As observações foram realizadas diariamente até a detecção de pêlos na cabeça, membro, dorso e abdome dos animais.

#### 4.7.1.4 Abertura palpebral ocular bilateral

A progênie foi observada a partir do 12º dia pós-natal quanto à abertura bilateral completa das pálpebras. As observações foram realizadas diariamente até a detecção da variável.

### 4.7.2. DESENVOLVIMENTO SEXUAL DOS MACHOS

#### 4.7.2.1 Descida dos testículos ao escroto

A progênie do sexo masculino foi avaliada quanto à descida dos testículos ao escroto a partir do 14º dia pós-natal. A palpação do escroto foi repetida diariamente em todos os machos da ninhada até serem detectados os dois testículos no escroto.

#### 4.7.2.2 Separação prepucial

A progênie do sexo masculino foi observada quanto à separação prepucial a partir do 30º dia pós-natal. O prepúcio foi retraído até se observar o pênis exposto. A observação foi realizada diariamente até que todos os machos da ninhada exibissem essa característica.

### 4.7.3. DESENVOLVIMENTO SEXUAL DAS FÊMEAS

#### 4.7.3.1 Abertura do canal vaginal

A progênie do sexo feminino foi observada quanto à abertura do canal vaginal a partir do 30º dia pós-natal. A observação foi realizada diariamente até que todas as fêmeas da ninhada exibissem a abertura completa do canal vaginal.

#### 4.7.3.2 Primeiro estro

Após a abertura do canal vaginal foram realizados lavados vaginais<sup>3</sup> diários até detectar o dia em que a maior população celular na lâmina fosse de células cornificadas (dia do primeiro estro).

#### 4.7.3.3 Regularidade do ciclo estral

Para determinar se a rata apresentava ciclo estral regular foram realizados lavados vaginais diários durante 15 dias. A fase do ciclo estral em que a fêmea se encontrava foi definido de acordo com o tipo celular predominante (Tabela 1). O ciclo foi considerado regular na presença de dois ou três estros em 15 dias.

TABELA 1 – FASES DO CICLO ESTRAL DE RATAS

<i><b>Fase do ciclo</b></i>	<i><b>Tipo celular predominante</b></i>	<i><b>Duração da fase (horas)</b></i>
Proestro	Epiteliais nucleadas	12
Estro	Epiteliais cornificadas	14
Metaestro	Epiteliais cornificadas e leucócitos	21
Diestro	Leucócitos	72

NOTA: Um ciclo é considerado completo entre dois estros consecutivos  
Um ciclo completo ocorre em quatro a cinco dias.

#### 4.7.4 AVALIAÇÃO DOS DESCENDENTES FEMININOS EM IDADE ADULTA

A progênie feminina, com  $85 \pm 5$  dias, teve aferida a massa corporal e foi sacrificada por decapitação em fase de proestro para determinação da massa absoluta e relativa dos órgãos: fígado, rins e útero.

##### 4.7.4.1 Sacrifício

Novos lavados vaginais foram realizados quando a progênie feminina completou 80 dias. No dia em que se detectou o proestro, as fêmeas tiveram a massa corporal aferida e foram sacrificadas. O sacrifício foi realizado através de decapitação. Uma rata de cada ninhada foi sacrificada para a avaliação dos descendentes femininos em idade adulta.

##### 4.7.4.2 Massa de órgãos

<sup>3</sup> Realizados conforme o método previamente descrito no item 4.3 Lavado vaginal, p. 17.

A progênie feminina teve a cavidade abdominal aberta para a retirada dos órgãos: fígado, rins e útero. Os órgãos retirados foram destituídos de gorduras adjacentes e tiveram as massas absolutas aferidas em balança analítica Gehaka BG 440. A massa relativa desses órgãos foi obtida pela fórmula: massa do órgão x massa ponderal<sup>-1</sup> x 100.

#### 4.7.5. AVALIAÇÃO DOS DESCENDENTES MASCULINOS EM IDADE ADULTA

Após a avaliação do desenvolvimento sexual os machos foram separados de acordo com a ninhada em caixas coletivas (cinco por caixa) para serem sacrificados em idade adulta. Dois machos de cada ninhada foram analisados em idade adulta.

##### 4.7.5.1 Sacrifício

A progênie masculina em idade adulta ( $150 \pm 30$  dias) teve a massa corporal aferida e na mesma data foi sacrificada por decapitação.

##### 4.7.5.2 Massa de órgãos

A progênie masculina teve a cavidade abdominal aberta para a retirada dos órgãos: testículos, epidídimos, fígado, rins, glândulas sexuais acessórias (vesículas seminais<sup>4</sup> e próstata<sup>5</sup>). Os órgãos retirados foram destituídos de gorduras adjacentes e tiveram as massas absolutas aferidas em balança analítica Gehaka BG 440. A massa relativa desses órgãos foi obtida pela fórmula: massa do órgão x massa ponderal<sup>-1</sup> x 100.

##### 4.7.5.3 Produção espermática diária, contagem de espermatozóides e tempo de trânsito espermático

Os testículos foram destituídos de sua albugínea e homogeneizados em 10 mL de cloreto de sódio 0,9 % com Triton X-100 em um homogeneizador de tecidos durante 1 minuto. O homogenato foi diluído dez vezes em solução salina 0,9 % para a contagem microscópica do número de espermátides resistentes a

---

<sup>4</sup> As vesículas seminais tiveram a massa aferida com as glândulas coaguladoras e após a remoção do líquido seminal.

<sup>5</sup> A próstata teve a massa aferida envolta pela cápsula.

homogeneização (espermátides no estágio 17 a 19 da espermatogênese), em câmara hemocitométrica (Bürker, Alemanha). O número de espermátides obtido da contagem das células nos testículos direito e esquerdo foram somados e divididos pela constante 6,1 (correspondente ao número de dias em que as espermátides em estágios 17 a 19 estão presentes no epitélio seminífero) para a conversão em produção espermática diária (ROBB, 1978). Para a contagem dos espermatozóides, a cauda do epidídimo foi recortada em pequenos fragmentos para possibilitar a ação do homogeneizador. O processamento da cauda do epidídimo foi realizado da mesma forma que o proposto para os testículos. O tempo de trânsito espermático na cauda do epidídimo foi obtido pela divisão do número de espermatozóides pela produção espermática diária (AMANN, 1976).

O número de células foi calculado levando-se em conta o volume da câmara de Bürker ( $5,76 \times 10^{-4}$  mL) e o fator de diluição utilizado (1:100).

#### 4.8 Teste uterotrófico

No experimento foram utilizados: o metamidofós comercial (Tamaron<sup>®</sup>), o carbaril comercial (Sevin<sup>®</sup>), a lambda-cialotrina comercial (Fortis<sup>®</sup>), o estradiol (17- $\alpha$ -etinilestradiol, com 95% de pureza, do laboratório Sigma-Aldrich, Steinheim - Germany) e o tamoxifeno (tamoxifeno citrato, com 99,5 % de pureza, do laboratório Galena, China). Os pesticidas foram diluídos em água destilada; e o estradiol e o tamoxifeno foram diluídos em óleo de canola.

Ratas Wistar imaturas ( $21 \pm 1$  dia; 10/grupo) foram tratadas pela via oral durante três dias consecutivos. A lambda-cialotrina foi administrada na dose de 5 mg x kg<sup>-1</sup>. O carbaril foi administrado na dose de 0,3 mg x kg<sup>-1</sup>. O metamidofós foi administrado na dose de 0,4 mg x kg<sup>-1</sup>. As substâncias foram administradas isoladas e misturadas “*in vivo*”. O veículo (água destilada, 5,0 mL x kg<sup>-1</sup> x dia<sup>-1</sup>) e o 17- $\alpha$ -etinilestradiol (0,4 mg x kg<sup>-1</sup> x dia<sup>-1</sup>) foram utilizados como controles negativo e positivo de estrogenicidade, o tamoxifeno (1,0 mg x kg<sup>-1</sup> x dia<sup>-1</sup>) foi utilizado como controle de antiestrogenicidade. Para avaliar o possível efeito antiestrogênico dos pesticidas, outros grupos de animais foram tratados com o 17- $\alpha$ -etinilestradiol (0,4 mg x kg<sup>-1</sup> x dia<sup>-1</sup>) e subsequente com os pesticidas isolados ou com os

pesticidas misturados *in vivo*. O volume de administração utilizado foi de 5,0 mL x kg<sup>-1</sup> de massa corporal para todos os tratamentos (ANDRADE e cols., 2002).

Vinte e quatro horas após a última administração, os animais tiveram aferidas as massas corporais e em seguida foram sacrificados por deslocamento endocervical. O útero foi retirado (seccionado logo abaixo de sua junção com a cérvix e na junção dos cornos uterinos com os ovários) e dissecado cuidadosamente para retirar toda a gordura adjacente. Em seguida, o útero foi perfurado e colocado entre duas folhas de papel filtro para retirada do líquido retido. A massa absoluta do útero foi aferida em balança analítica Gehaka BG 440. A massa relativa do útero foi determinada e registrada percentualmente em relação ao peso corporal (ANDRADE e cols., 2002).

#### **4.9 Análise estatística**

As variáveis com medidas intervalares e que apresentaram distribuição normal foram analisadas pela análise de variância (ANOVA). As diferenças entre os grupos foram determinadas pelo teste Bonferroni. As variáveis com medidas ordinais ou aquelas que não apresentarem distribuição normal ou homogeneidade entre as variâncias, foram analisadas através do teste Kruskal-Wallis e as variâncias foram analisadas pelo teste Dunn. Variáveis indicadas como índices ou percentuais foram analisadas pelo teste qui-quadrado. O nível de significância estatístico utilizado foi de 5 % ( $p < 0,05$ ). A massa dos filhotes e os parâmetros de desenvolvimento geral e sexual foram analisados utilizando as ninhadas como unidades estatísticas.

A massa corporal das progenitoras foi analisada por análise de variância de uma via. Os dados da prenhez e lactação (tamanho das ninhadas, duração da gestação e o número de implantes uterinos) e as variáveis de desenvolvimento geral e sexual das progênes foram avaliados pelo teste Kruskal-Wallis, quando não apresentaram distribuição normal. O tempo de transito espermático foi analisado por ANOVA aplicando-se o teste de Bonferroni para determinar a diferença estatística entre os grupos.

A massa corporal e as massas absoluta e relativa de órgãos, a produção espermática diária, a contagem de espermatozóides na cauda do epidídimo foram analisados por análise de variância de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni.



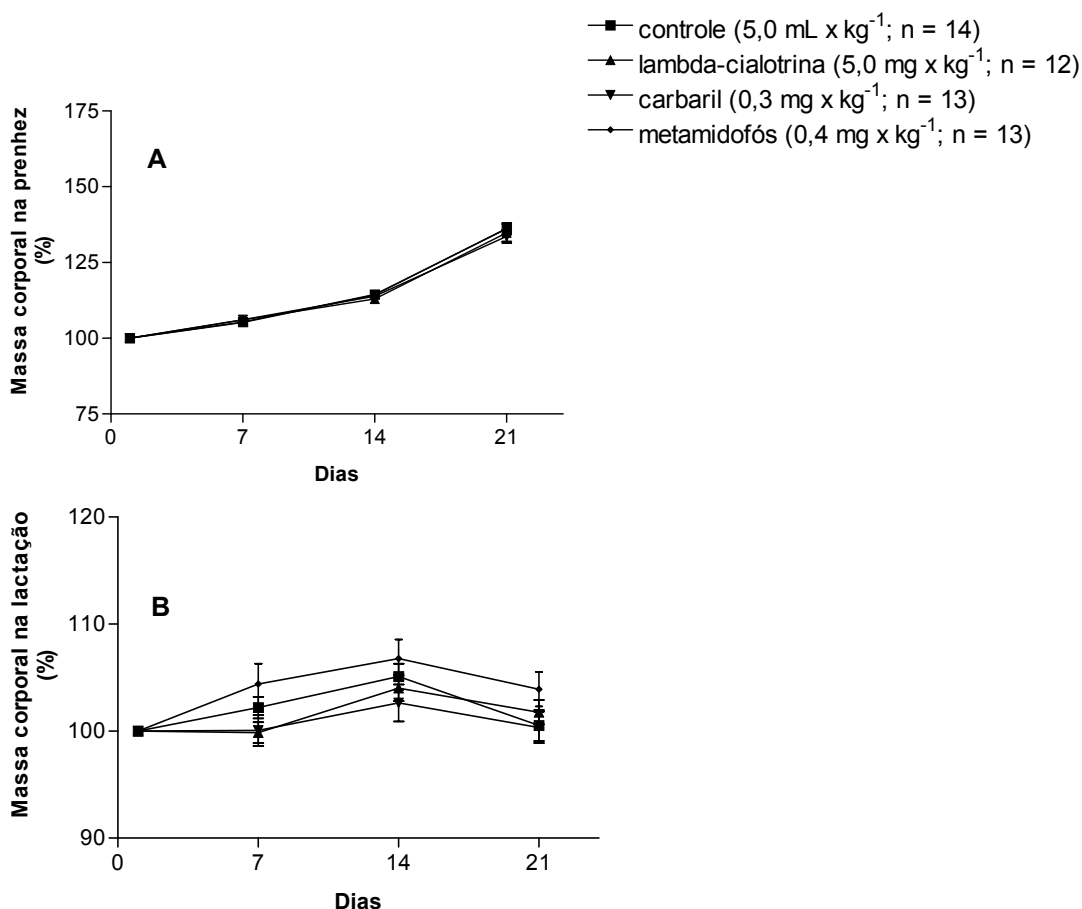
O índice de nascimento, viabilidade e desmame; as perdas pós-implante e a razão sexual foram analisadas pelo teste qui-quadrado ( $\chi^2$ ). Para a análise estatística e a confecção dos gráficos foi utilizado o programa *Graphpad Prism*® v.3.0.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Dados das progenitoras

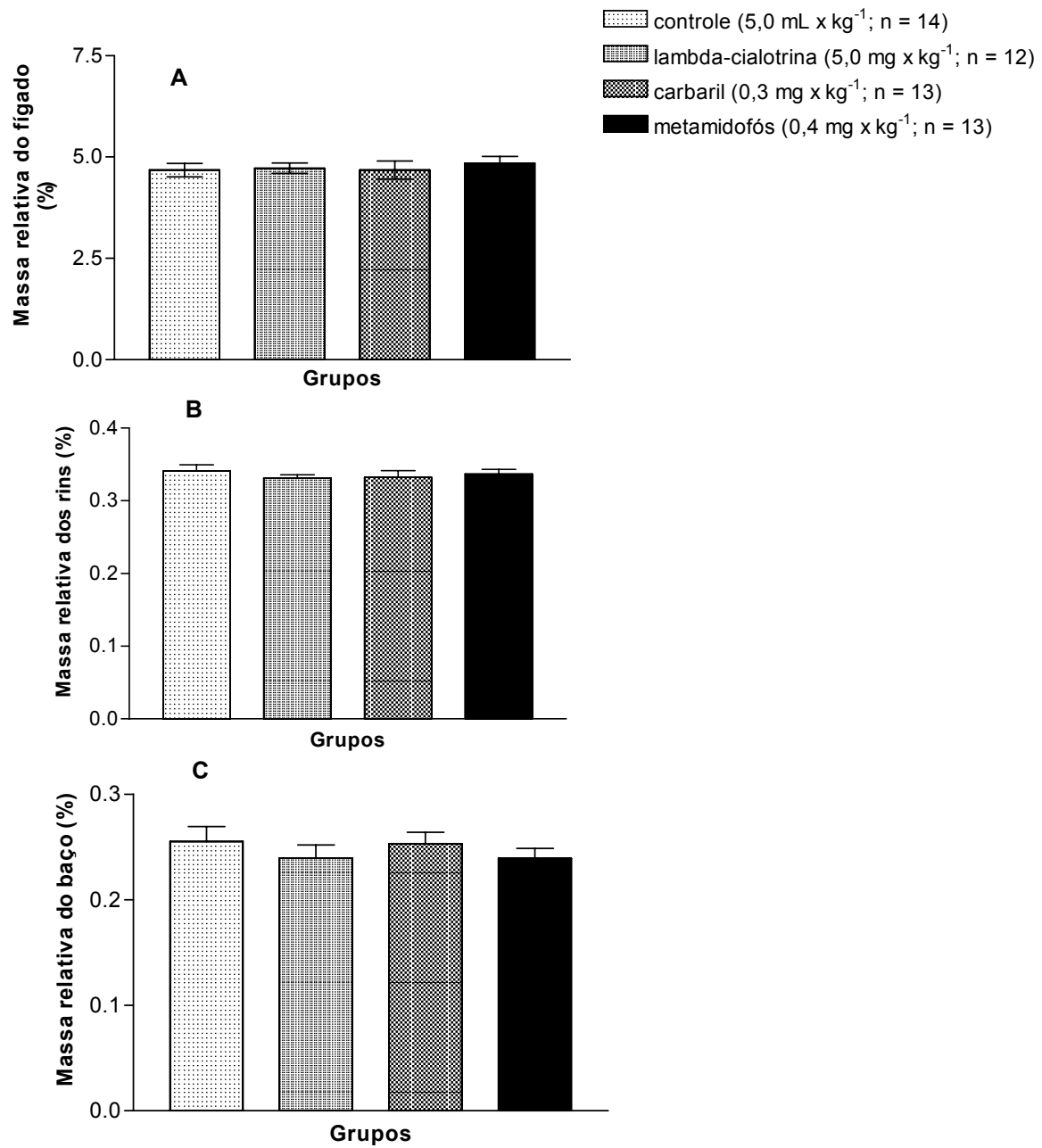
A exposição diária aos pesticidas lambda-cialotrina, carbaril e metamidofós não alterou o desenvolvimento ponderal das progenitoras na gestação (Figura 4-A) e na lactação (Figura 4-B). Os órgãos (fígado, rins e baço) retirados das progenitoras após o sacrifício, também não apresentaram diferenças na massa relativa (Figuras 5-A, 5-B e 5-C respectivamente). A duração da prenhez, o número de implantes uterinos, o percentual de perda pós-implante, o tamanho das ninhadas, a razão sexual dos filhotes e os índices de parto, nascimento, viabilidade e desmame também não foram afetados por nenhuma das substâncias testadas (Tabela 2).

FIGURA 5 – MASSA CORPORAL DE RATAS EXPOSTAS A LAMBDA-CIALOTRINA, AO CARBARIL E AO METAMIDOFÓS DURANTE A PREENHEZ E A LACTAÇÃO



NOTAS: Desenvolvimento ponderal (%) das progenitoras expostas diariamente pela via oral durante a prenhez (A) e a lactação (B). A exposição ocorreu do sexto dia de prenhez ao 21º dia de lactação. Os resultados expressam as médias ± erro padrão da média.

FIGURA 6 – MASSA RELATIVA DOS ÓRGÃOS DE RATAS EXPOSTAS A LAMBDA-CIALOTRINA, AO CARBARIL E AO METAMIDOFÓS NA PRENHEZ E NA LACTAÇÃO



NOTA: Massa relativa dos órgãos: fígado (A), rins(B) e baço (C), das progenitoras expostas diariamente pela via oral.

Os resultados expressam as médias % ± erro padrão da média.

TABELA 2 - ÍNDICES REPRODUTIVOS DE RATAS EXPOSTAS A LAMBDA-CIALOTRINA, AO CARBARIL E AO METAMIDOFÓS DURANTE A PRENHEZ E A LACTAÇÃO

	Grupos (mg x kg <sup>-1</sup> x dia <sup>-1</sup> )			
	Controle (0,0)	Lambda-cialotrina (5,0)	Carbaril (0,3)	Metamidofós (0,4)
Número de progenitoras	14	12	13	13
Tamanho das ninhadas	9,9 ± 1,03	9,3 ± 0,77	9,1 ± 1,07	9,7 ± 0,71
Duração da prenhez (dias)	21,4 ± 0,14	22,2 ± 0,17	22,2 ± 0,23	22,2 ± 0,15
Nº de implantes	10,4 ± 0,98	9,5 ± 0,76	10,1 ± 0,98	10,9 ± 0,70
Perdas pós-implantes (%) <sup>(2)</sup>	7,8	1,7	11,8	9,7
Índice de parto (%) <sup>(2)</sup>	100	92	87	100
Índice de nascimento (%) <sup>(2)</sup>	100	99	92	100
Índice de viabilidade (%) <sup>(2)</sup>	94	97	92	99
Índice de desmame (%) <sup>(2)</sup>	90	93	86	92
Razão sexual <sup>(2)</sup> (% machos: fêmeas)	49	50	51	51

NOTAS: As progenitoras foram expostas aos pesticidas pela via oral do sexto dia de prenhez ao 21º dia de lactação.

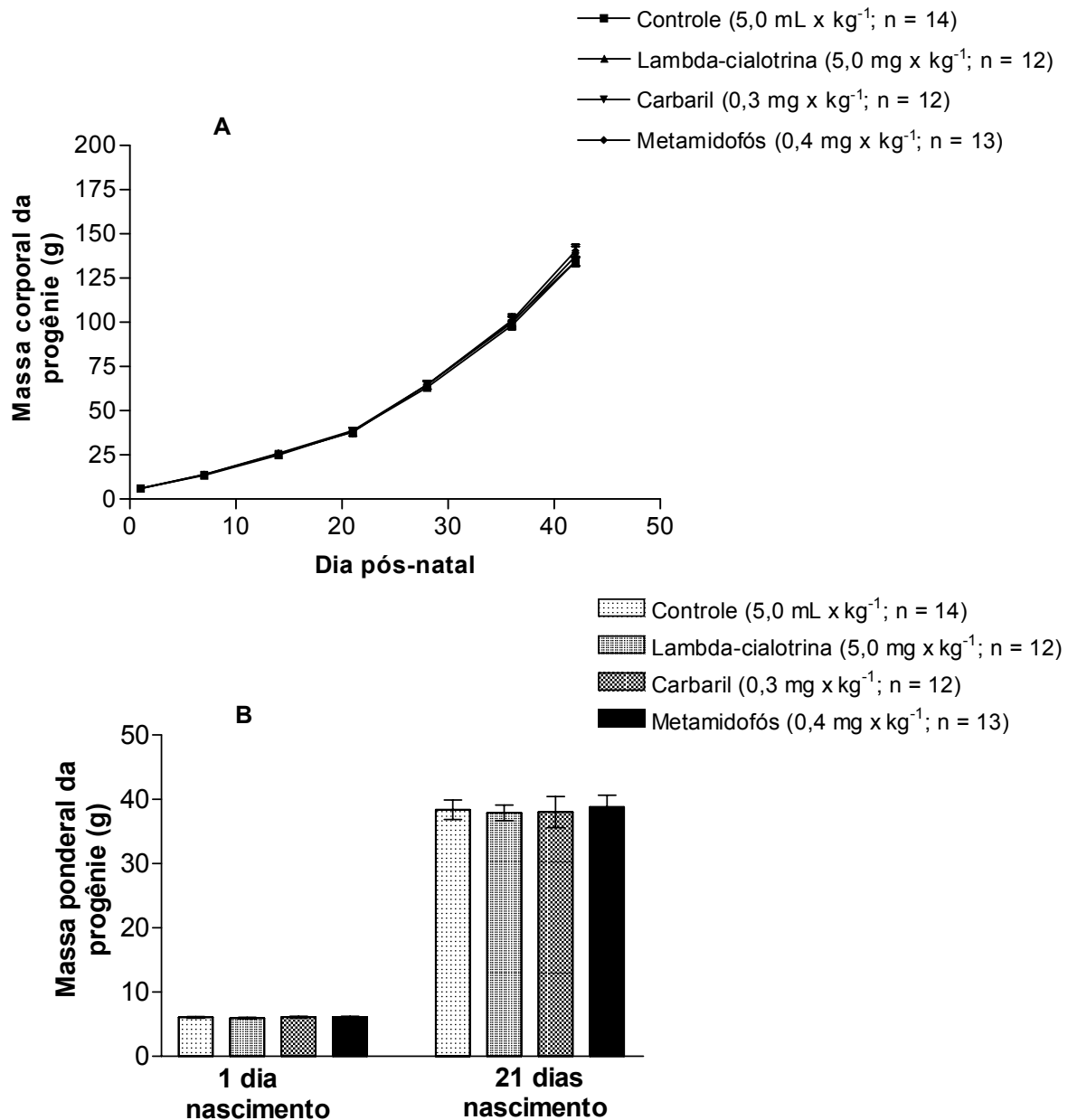
Os resultados expressam as médias ± erro padrão, exceto quando indicado de outra forma.

<sup>(2)</sup> O teste estatístico utilizado foi o qui-quadrado.

## 5.2 Desenvolvimento geral da progênie

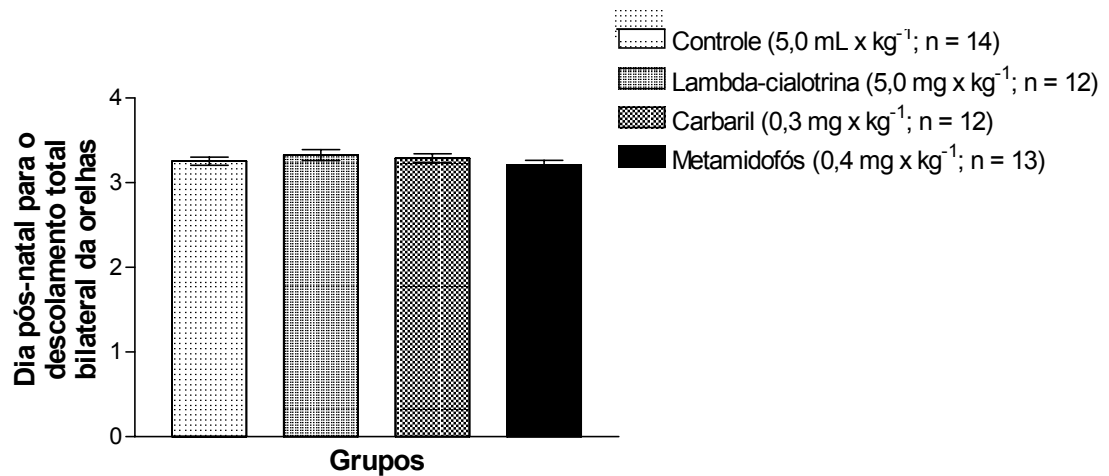
O desenvolvimento geral dos descendentes expostos a lambda-cialotrina, ao carbaril e ao metamidofós, *in utero* e na lactação são ilustrados pelo desenvolvimento ponderal semanal (Figura 6-A) e pela comparação entre a massa da progênie ao nascimento e no desmame (Figura 6-B). Nas Figuras 7-9 pode-se observar outras variáveis que caracterizam o desenvolvimento geral dos descendentes. A exposição aos pesticidas não influenciou o ganho de massa da progênie, nem o tempo médio (dias) para o surgimento das características do desenvolvimento geral investigadas: descolamento dos pavilhões auriculares (Figura 7) e abertura de olhos (Figura 8). O aparecimento de pêlos (Figura 9) diferiu significativamente nos grupos expostos a lambda-cialotrina ( $p < 0,001$  ANOVA - Bonferroni) e ao metamidofós ( $p < 0,05$  ANOVA - Bonferroni) comparados ao controle (Figura 9), porém apenas em algumas horas.

FIGURA 7 – GANHO DE MASSA CORPORAL, MASSA AO NASCIMENTO E MASSA AO DESMAME DA PROGÊNIE EXPOSTA A LAMBDA-CIALOTRINA, AO CARBARIL E AO METAMIDOFÓS *IN UTERO* E NA LACTAÇÃO



NOTAS: Em (A) apresenta-se o ganho de massa corporal semanal do nascimento até o 42º dia de vida. Em (B) apresenta-se a massa corporal ao nascimento (dia 1) e ao desmame (dia 21). O n representa o número de ninhadas. Os resultados expressam as médias em gramas  $\pm$  erro padrão da média.

FIGURA 8 – DESCOLAMENTO DOS PAVILHÕES AUDITIVOS DA PROGENIE EXPOSTA A LAMBDA-CIALOTRINA, AO CARBARIL E AO METAMIDOFÓS *IN UTERO* E NA LACTAÇÃO

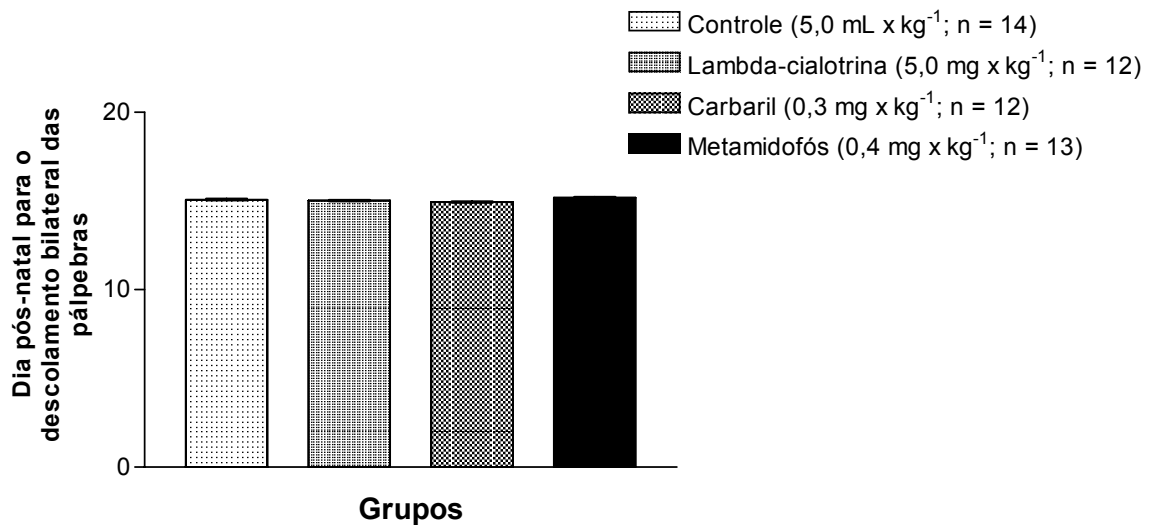


NOTAS: Característica de desenvolvimento geral observada a partir do nascimento.

Os resultados expressam as médias em dias para o descolamento completo dos pavilhões auditivos  $\pm$  erro padrão da média.

O n representa o número de ninhadas.

FIGURA 9 – ABERTURA DAS PÁLPEBRAS OCULARES DA PROGENIE EXPOSTA A LAMBDA-CIALOTRINA, AO CARBARIL E AO METAMIDOFÓS *IN UTERO* E NA LACTAÇÃO

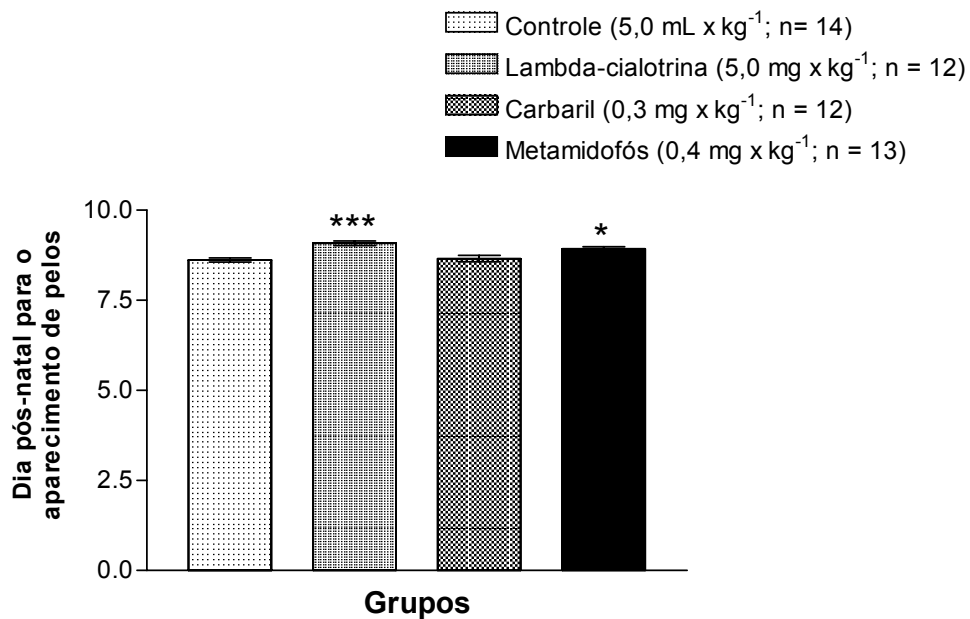


NOTAS: Característica de desenvolvimento geral observada a partir do 12º dia pós-natal.

Os resultados expressam as médias em dias para o descolamento completo bilateral das pálpebras  $\pm$  erro padrão da média.

O n representa o número de ninhadas.

FIGURA 10 – APARECIMENTO DE PÊLOS NA PROGÊNIE EXPOSTA A LAMBDA-CIALOTRINA, AO CARBARIL E AO METAMIDOFÓS *IN UTERO* E NA LACTAÇÃO



NOTAS: Característica de desenvolvimento geral observada a partir do sexto dia pós-natal.

Os resultados expressam as médias em dias para os pêlos cobrirem o dorso, o ventre e as patas  $\pm$  erro padrão da média.

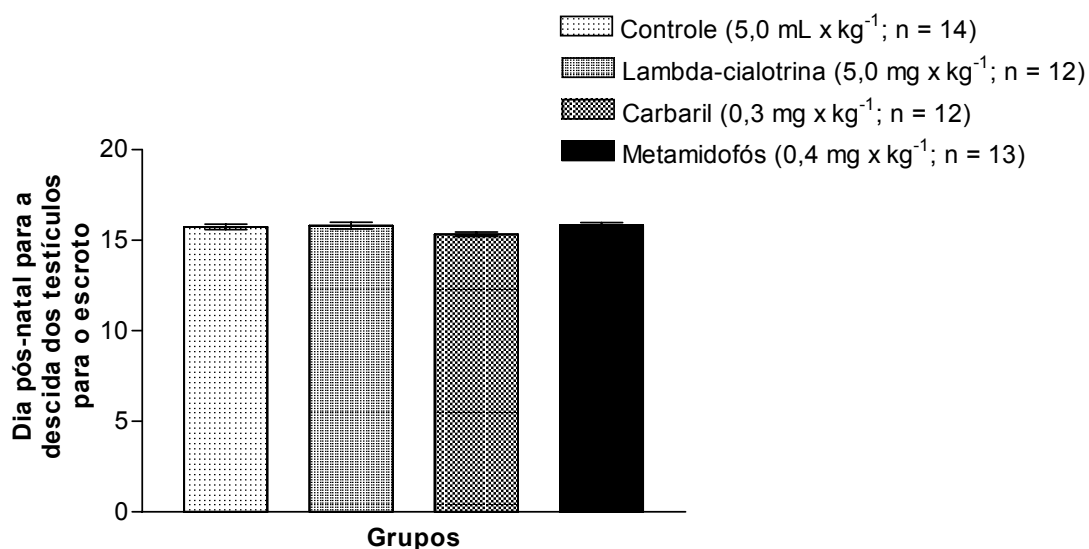
Difere significativamente do controle (\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*;  $p < 0,001$ ): ANOVA - Bonferroni.

O n representa o número de ninhadas.

### 5.3 Desenvolvimento sexual da progênie

A exposição *in utero* e na lactação aos pesticidas lambda-cialotrina, carbaril e metamidofós não alterou o período médio (dias) para a descida dos testículos ao escroto (Figura 10), para a abertura do canal vaginal (Figura 11) ou para a separação prepucial (Figura 12), nas doses testadas.

FIGURA 11 – DESCIDA DOS TESTÍCULOS AO ESCROTO, OBSERVADA NA PROGÊNIE MASCULINA EXPOSTA A LAMBDA-CIALOTRINA, AO CARBARIL E AO METAMIDOFÓS *IN UTERO* E NA LACTAÇÃO



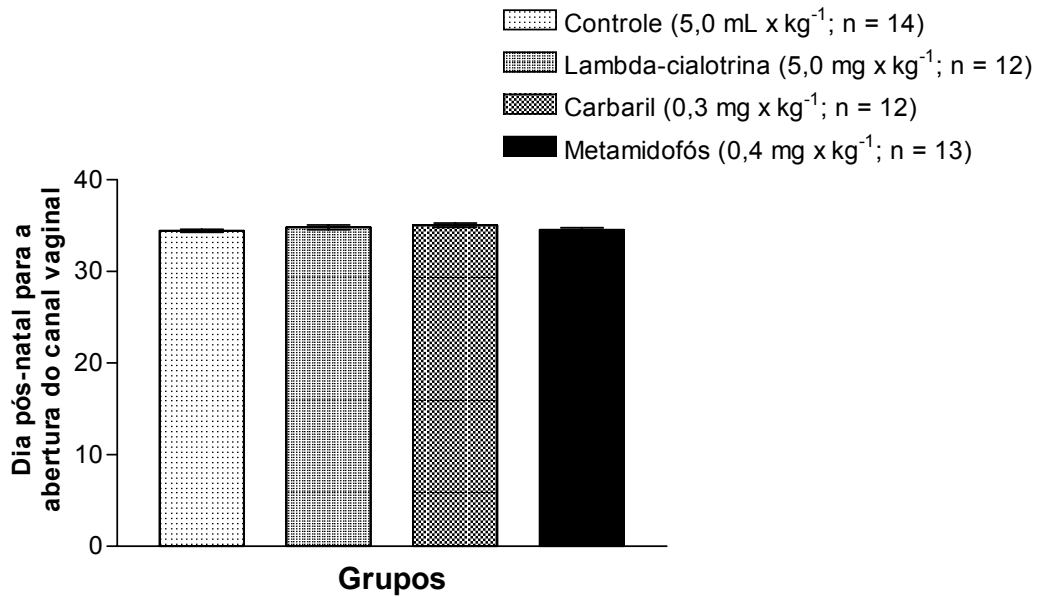
NOTAS: A detecção da característica envolveu a observação diária dos animais a partir do 14º dia pós-natal.

Os resultados expressam as médias em dias para a descida dos dois testículos ao escroto  $\pm$  erro padrão da média.

O n representa o número de ninhadas.



FIGURA 12 – ABERTURA DO CANAL VAGINAL OBSERVADA NA PROGÊNIE FEMININA EXPOSTA A LAMBDA-CIALOTRINA, AO CARBARIL E AO METAMIDOFÓS *IN UTERO* E NA LACTAÇÃO

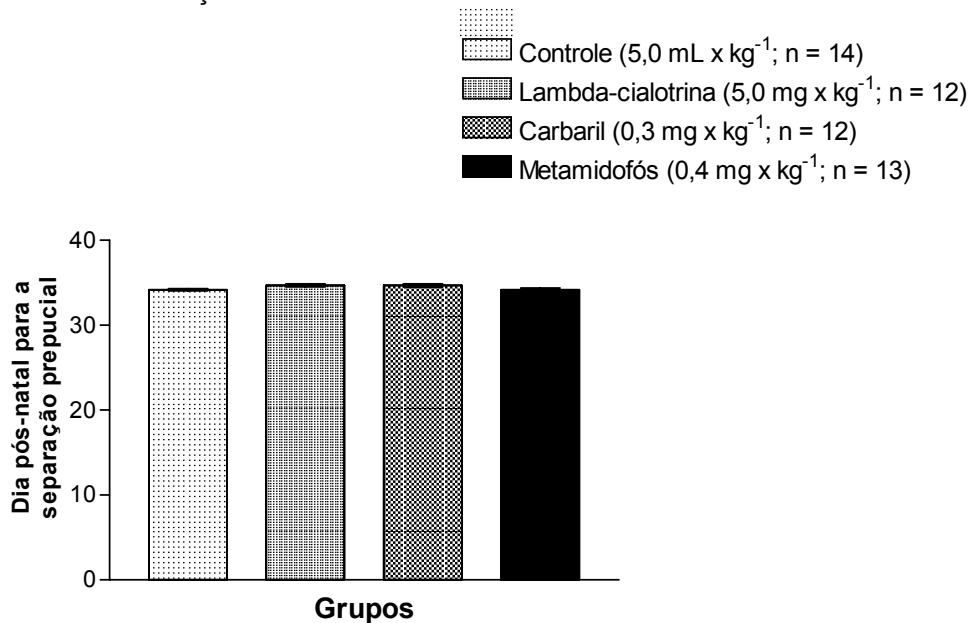


NOTAS: A progênie feminina foi observada a partir do 30º dia pós-natal para a detecção da abertura do canal vaginal.

Os resultados expressam as médias em dias para a abertura do canal vaginal ± erro padrão da média.

O n representa o número de ninhadas.

FIGURA 13 – SEPARAÇÃO PREPUCIAL OBSERVADA NA PROGÊNIE MASCULINA EXPOSTA A LAMBDA-CIALOTRINA, AO CARBARIL E AO METAMIDOFÓS *IN UTERO* E NA LACTAÇÃO



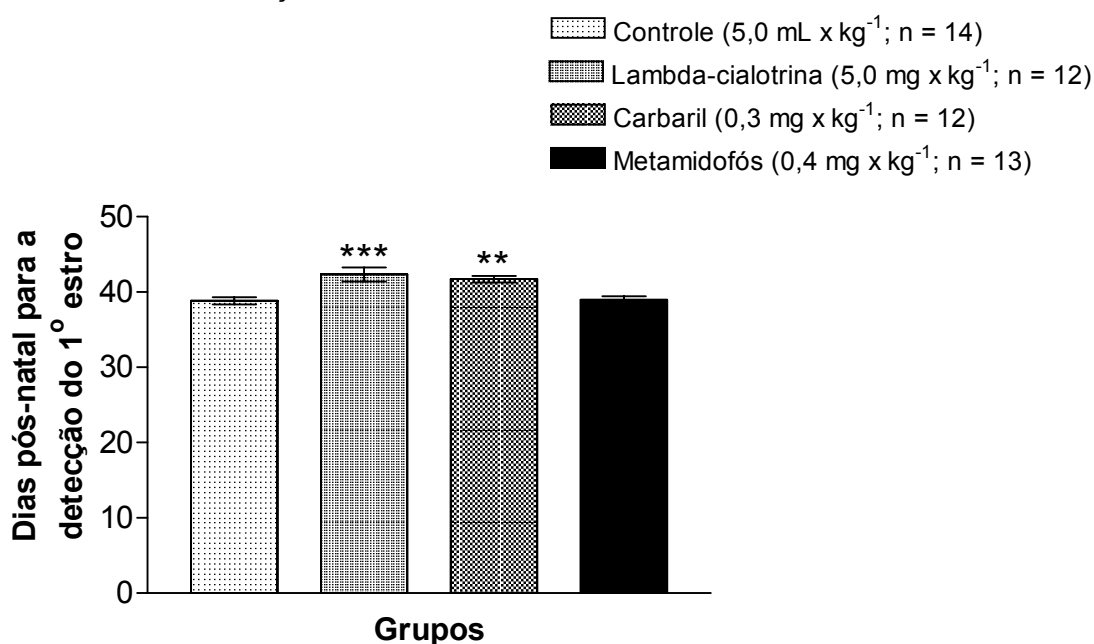
NOTAS: A progênie masculina foi observada a partir do 30º dia pós-natal para a detecção da separação prepucial.

Os resultados expressam as médias em dias para a separação prepucial completa ± erro padrão da média.

O n representa o número de ninhadas.

O primeiro estro observado após a abertura do canal vaginal ocorreu significativamente mais tarde nos grupos expostos a lambda-cialotrina e ao carbaril em comparação ao grupo controle (Figura 13 e Tabela 3). O grupo exposto ao metamidofós não diferiu do controle. Apesar dessa alteração não houve diferença na regularidade do ciclo estral, nem no intervalo entre estros (Tabela 3).

FIGURA 14 – DETECÇÃO DO PRIMEIRO ESTRO DA PROGÊNIE FEMININA EXPOSTA A LAMBDA-CIALOTRINA, AO CARBARIL E AO METAMIDOFÓS *IN UTERO* E NA LACTAÇÃO



NOTAS: A detecção dessa característica envolveu a execução de lavados vaginais diários a partir da observação da abertura do canal vaginal.

Os resultados expressam as médias em dias para a detecção do primeiro estro  $\pm$  erro padrão da média.

Difere significativamente do controle (\*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ): ANOVA – Bonferroni.

O n representa o número de ninhadas.

TABELA 3 - VARIÁVEIS DO DESENVOLVIMENTO SEXUAL DA PROGÊNIE FEMININA EXPOSTA A LAMBDA-CIALOTRINA, AO CARBARIL E AO METAMIDOFÓS *IN UTERO* E NA LACTAÇÃO

ÍNDICES/ GRUPOS	Grupos (mg x kg <sup>-1</sup> x dia <sup>-1</sup> )			
	Controle (0,0)	Lambda-cialotrina (5,0)	Carbaril (0,3)	Metamidofós (0,4)
Intervalo (dias)	6,2 ± 0,2	6,2 ± 0,3	6,0 ± 0,2	6,2 ± 0,3
Dpn <sup>(1)</sup> 1º.estro	38,8 ± 0,5	42,3 ± 0,9***	41,7 ± 0,5**	39,0 ± 0,5
Ciclo regular (%)	96 (53)	93 (41)	96 (50)	92 (45)
Ciclo irregular (%)	4 (2)	7 (3)	4 (2)	8 (4)

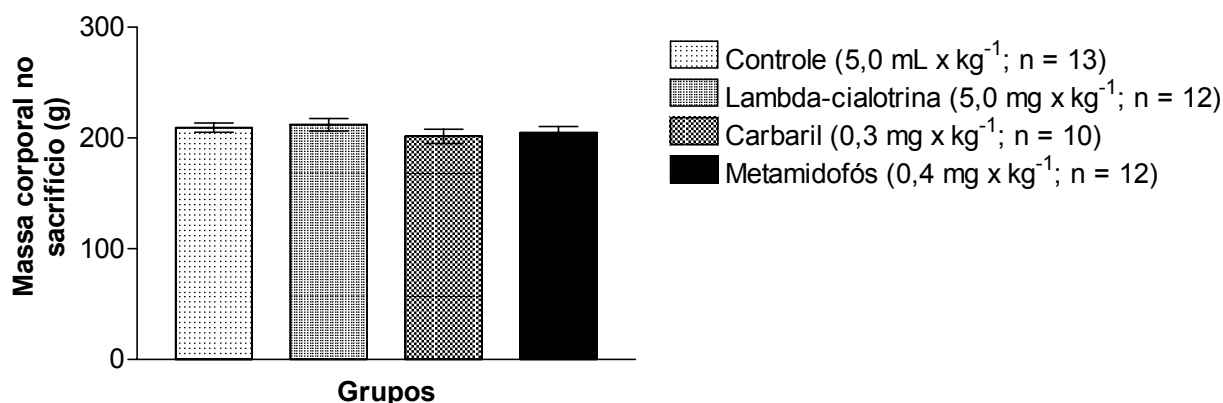
NOTAS: Difere significativamente do controle (\*\* p < 0,01 e \*\*\* p < 0,001): ANOVA – Bonferroni.

<sup>(1)</sup>dpn = dia pós-natal. Os números entre parênteses correspondem ao número de animais

#### 5.4 Progênie feminina em idade adulta

A progênie feminina sacrificada em idade adulta não apresentou diferença na massa corporal (Figura 14), nem na massa absoluta e relativa dos órgãos: fígado (Figura 15), rins (Figura 16) e útero (Figura 17).

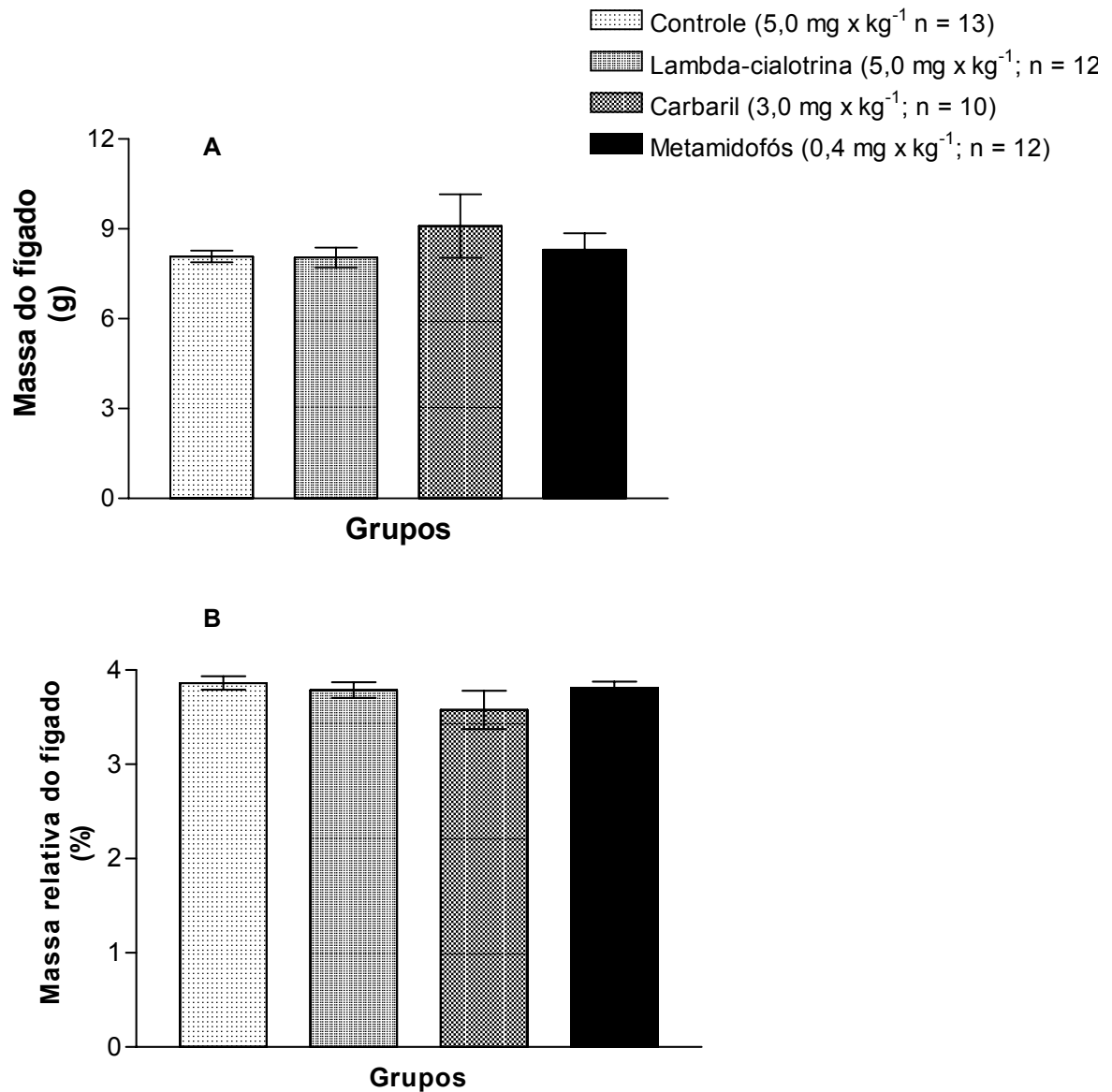
FIGURA 15 – MASSA CORPORAL DA PROGÊNIE FEMININA ADULTA EXPOSTA A LAMBDA-CIALOTRINA, AO CARBARIL E AO METAMIDOFÓS *IN UTERO* E NA LACTAÇÃO



NOTAS: A progênie feminina teve a massa corporal aferida no dia do sacrifício (80 ± 10 dias de vida). Os resultados expressam as médias da massa corporal em gramas no dia do sacrifício ± erro padrão da média.

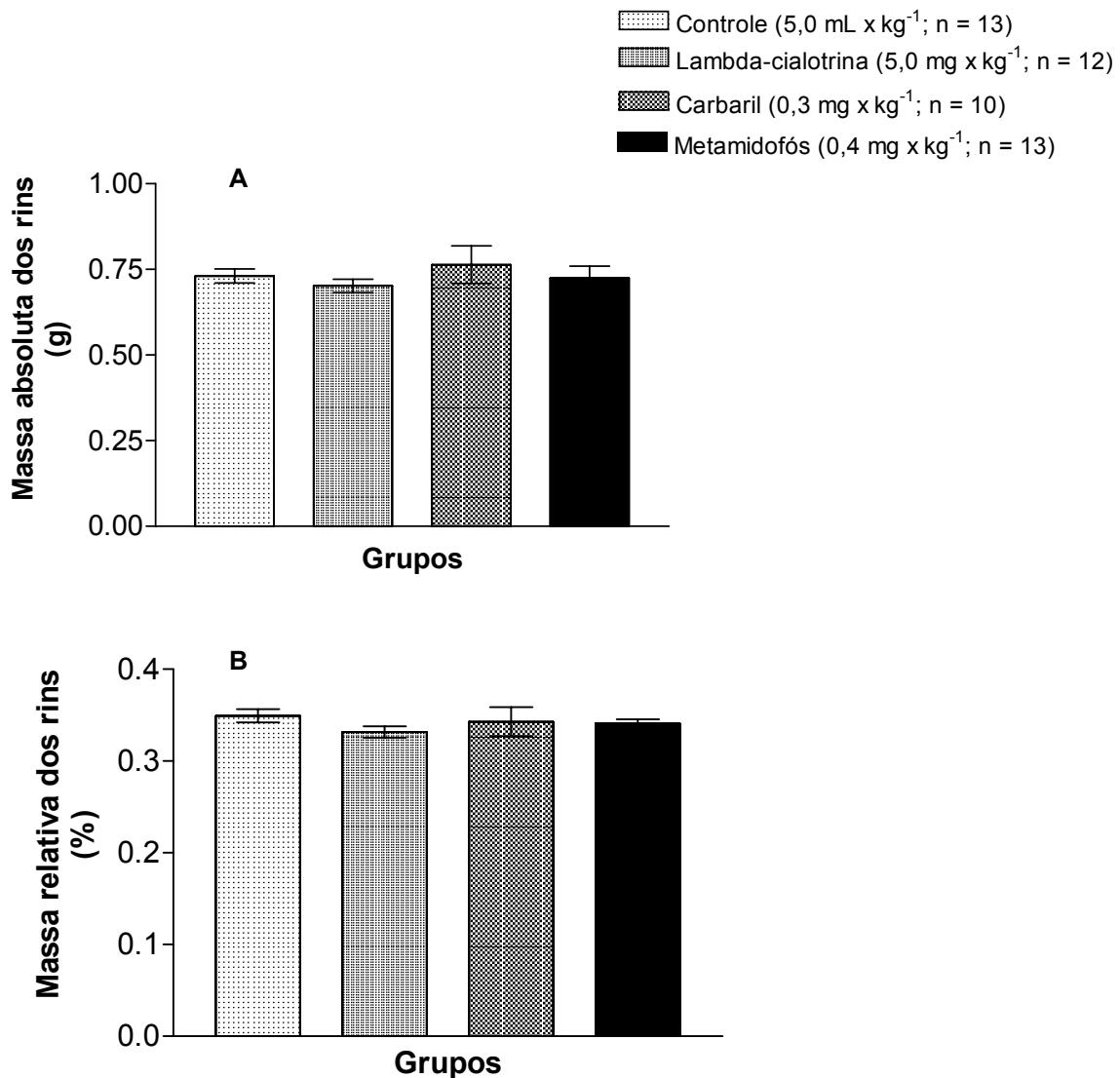
O n representa o número de ratas utilizadas para essa avaliação, um animal de cada ninhada.

FIGURA 16 – MASSA ABSOLUTA E RELATIVA DO FÍGADO DA PROGÊNIE FEMININA ADULTA EXPOSTA A LAMBDA-CIALOTRINA, AO CARBARIL E AO METAMIDOFÓS *IN UTERO* E NA LACTAÇÃO



NOTAS: Os resultados expressam as médias em gramas (A) e em percentual (B) da massa do fígado no dia do sacrifício  $\pm$  erro padrão da média.  
 O n representa o número de ratas utilizadas para essa avaliação, um animal de cada ninhada.

FIGURA 17 – MASSA ABSOLUTA E RELATIVA DOS RINS DA PROGÊNIE FEMININA ADULTA EXPOSTA A LAMBDA-CIALOTRINA, AO CARBARIL E AO METAMIDOFÓS *IN UTERO* E NA LACTAÇÃO

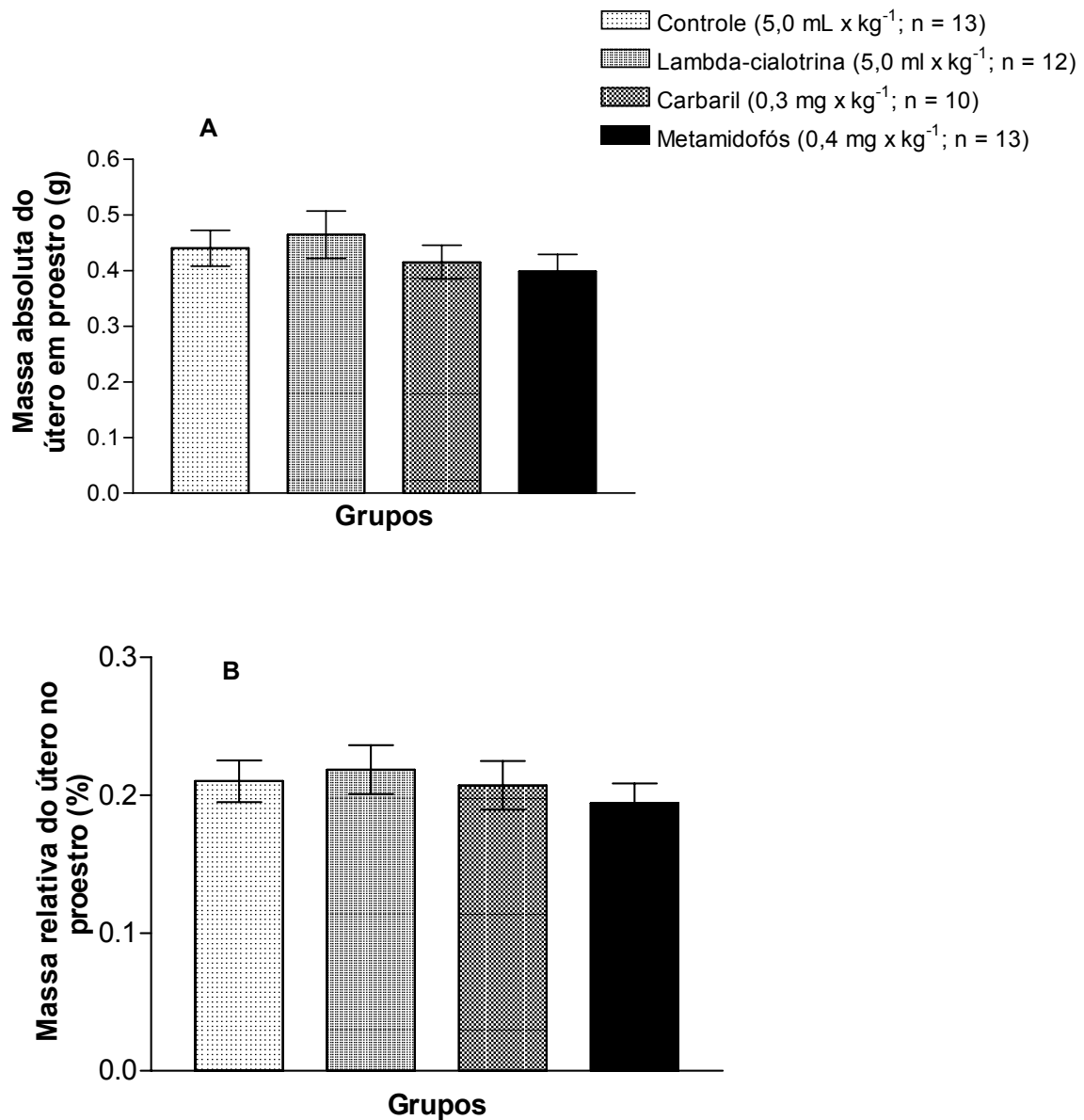


NOTAS: Os resultados expressam as médias, em gramas (A) e em percentual (B), das massas dos rins no dia do sacrifício  $\pm$  erro padrão da média.

Os valores dos rins são representados pela média dos lados direito e esquerdo.

O n representa o número de ratas utilizadas para essa avaliação, um animal de cada ninhada.

FIGURA 18 – MASSA ABSOLUTA E RELATIVA DO ÚTERO DA PROGÊNIE FEMININA ADULTA EXPOSTA A LAMBDA-CIALOTRINA, AO CARBARIL E AO METAMIDOFÓS *IN ÚTERO* E NA LACTAÇÃO



NOTAS: Massa absoluta (A) e relativa (B) do útero retirado no proestro da progênie feminina em idade adulta.

Os resultados representam as médias em gramas e percentual  $\pm$  erro padrão da média.

O n representa o número de ratas utilizadas para essa avaliação, um animal de cada ninhada.

## 5.5 Progênie masculina em idade adulta

### 5.5.1 MASSA CORPORAL E MASSA RELATIVA DE ÓRGÃOS

A massa corporal e a massa absoluta (Tabela 4) e relativa (Tabela 5) dos órgãos (testículos, epidídimos, próstata, vesícula seminal, fígado e rins) dos animais adultos expostos *in utero* e na lactação aos pesticidas lambda-cialotrina, carbaril e metamidofós não diferiu significativamente entre os grupos.

TABELA 4 - MASSA CORPORAL E MASSA ABSOLUTA DOS ÓRGÃOS DA PROGÊNIE MASCULINA EM IDADE ADULTA, EXPOSTA A LAMBDA-CIALOTRINA, AO CARBARIL E AO METAMIDOFÓS *IN UTERO* E NA LACTAÇÃO

	Grupos (mg x kg <sup>-1</sup> x dia <sup>-1</sup> )			
	Controle (0,0)	Lambda-cialotrina (5,0)	Carbaril (0,3)	Metamidofós (4,0)
Número de animais	24	23	22	24
Massa corporal (g)	392 ± 9	383 ± 7	384 ± 6	389 ± 9
Testículos (g) <sup>a</sup>	1,59 ± 0,03	1,50 ± 0,05	1,54 ± 0,06	1,61 ± 0,02
Epidídimos (g) <sup>a</sup>	0,57 ± 0,01	0,56 ± 0,02	0,56 ± 0,02	0,58 ± 0,01
Próstata (g)	0,46 ± 0,02	0,39 ± 0,02	0,42 ± 0,02	0,40 ± 0,02
Vesícula Seminal (g)	0,82 ± 0,03	0,72 ± 0,02	0,79 ± 0,02	0,80 ± 0,03
Fígado (g)	13,49 ± 0,37	13,39 ± 0,26	13,17 ± 0,30	13,43 ± 0,36
Rins (g) <sup>a</sup>	1,26 ± 0,03	1,21 ± 0,02	1,22 ± 0,03	1,22 ± 0,02

NOTAS: Os resultados expressam as médias em gramas ± erro padrão da média.

<sup>a</sup> Os resultados são expressos pela média dos órgãos pares, (órgão direito + órgão esquerdo) x 2<sup>-1</sup>.

TABELA 5 - MASSA CORPORAL E MASSA RELATIVA DOS ÓRGÃOS DA PROGÊNIE MASCULINA EM IDADE ADULTA, EXPOSTA A LAMBDA-CIALOTRINA, AO CARBARIL E AO METAMIDOFÓS *IN UTERO* E NA LACTAÇÃO

	Grupos (mg x kg <sup>-1</sup> x dia <sup>-1</sup> )			
	Controle (0,0)	Lambda- cialotrina (5,0)	Carbaril (0,3)	Metamidofós (4,0)
Número de animais	24	23	22	24
Massa corporal (g)	392 ± 9	383 ± 7	384 ± 6	389 ± 9
Testículos (%) <sup>a</sup>	0,42 ± 0,010	0,40 ± 0,007	0,42 ± 0,006	0,42 ± 0,007
Epidídimos (%) <sup>a</sup>	0,15 ± 0,003	0,15 ± 0,004	0,15 ± 0,004	0,15 ± 0,003
Próstata (%)	0,12 ± 0,005	0,10 ± 0,004	0,11 ± 0,006	0,10 ± 0,005
Vesícula Seminal (%)	0,21 ± 0,005	0,19 ± 0,005	0,21 ± 0,007	0,21 ± 0,007
Fígado (%)	3,44 ± 0,06	3,50 ± 0,06	3,43 ± 0,04	3,45 ± 0,06
Rins (%) <sup>a</sup>	0,32 ± 0,005	0,32 ± 0,004	0,32 ± 0,005	0,31 ± 0,003

NOTAS: Os resultados expressam as médias em percentual ± erro padrão da média.

<sup>a</sup> Os resultados são expressos pela média dos órgãos pares, (órgão direito + órgão esquerdo) x 2<sup>-1</sup>.

#### 5.5.2 PRODUÇÃO ESPERMÁTICA DIÁRIA, CONTAGEM DE ESPERMATOZÓIDES NA CAUDA DO EPIDÍDIMO E TEMPO DE TRÂNSITO ESPERMÁTICO

A produção espermática diária, a contagem de espermatozóides na cauda do epidídimo e o tempo de trânsito espermático dos animais adultos expostos *in utero* e na lactação aos pesticidas lambda-cialotrina, carbaril e metamidofós são ilustrados na Tabela 6. A concentração média de espermatozóides na cauda do epidídimo e a produção espermática diária não foram significativamente afetadas nos machos adultos. O tempo de trânsito espermático na cauda do epidídimo também foi similar em todos os grupos.



TABELA 6 - PRODUÇÃO ESPERMÁTICA DIÁRIA, NÚMERO DE ESPERMATOZÓIDES NA CAUDA DO EPIDÍDIMO E TEMPO DE TRÂNSITO ESPERMÁTICO DA PROGÊNIE MASCULINA EXPOSTA A LAMBDA-CIALOTRINA, AO CARBARIL E AO METAMIDOFÓS *IN UTERO* E NA LACTAÇÃO

	Grupos (mg x kg <sup>-1</sup> x dia <sup>-1</sup> )			
	Controle (0,0)	Lambda-cialotrina (5,0)	Carbaril (0,3)	Metamidofós (0,4)
Número de animais	24	23	22	24
Produção espermática diária (x 10 <sup>6</sup> )	60,8 ± 3,2	53,58 ± 2,2	54,61 ± 2,6	56,33 ± 2,0
Nº espermatozóides (x 10 <sup>6</sup> )	316 ± 24	299 ± 20	299 ± 18	353 ± 18
Tempo de trânsito espermático (dias)	5,63 ± 0,36	5,67 ± 0,38	5,75 ± 0,45	6,30 ± 0,24

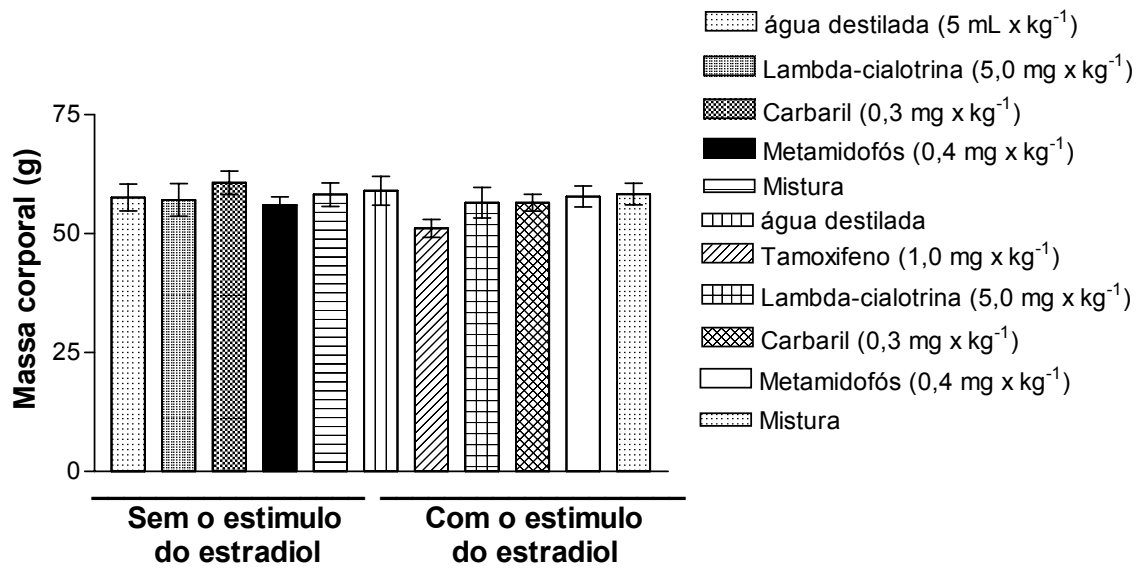
NOTAS: As contagens espermáticas foram realizadas no dia do sacrifício da progênie masculina adulta exposta *in utero* e na lactação aos pesticidas lambda-cialotrina, carbaril e metamidofós.

Os resultados expressam as médias ± erro padrão da média.

## 5.6 Teste uterotrófico

Os animais do teste uterotrófico não tiveram interferência das drogas na massa corporal, aferida no dia do sacrifício (Figura 18). A massa absoluta do útero foi estatisticamente maior no grupo exposto ao metamidofós ( $p < 0,05$ ; ANOVA - Bonferroni) e no grupo mistura ( $p < 0,001$ ; ANOVA - Bonferroni), quando comparado ao grupo água destilada (Figura 19). Os animais expostos ao tamoxifeno e estradiol juntos apresentaram o útero significativamente menor (Figura 19 e Figura 20) em comparação ao grupo exposto ao estradiol, analisando-se a massa relativa e absoluta ( $p < 0,01$ ; ANOVA – Bonferroni). A massa relativa do útero foi estatisticamente maior no grupo exposto à mistura de pesticidas (Figura 20) em comparação com o grupo que recebeu água destilada sem estradiol.

FIGURA 19 – MASSA CORPORAL DE RATAS IMATURAS EXPOSTAS A LAMBDA-CIALOTRINA, AO CARBARIL E AO METAMIDOFÓS AFERIDA NO SACRIFÍCIO - TESTE UTEROTRÓFICO



NOTAS: Massa corporal de ratas (21<sup>o</sup> dia pós-natal) expostas aos pesticidas isolados e misturados, com e sem o estímulo uterotrófico do estradiol.

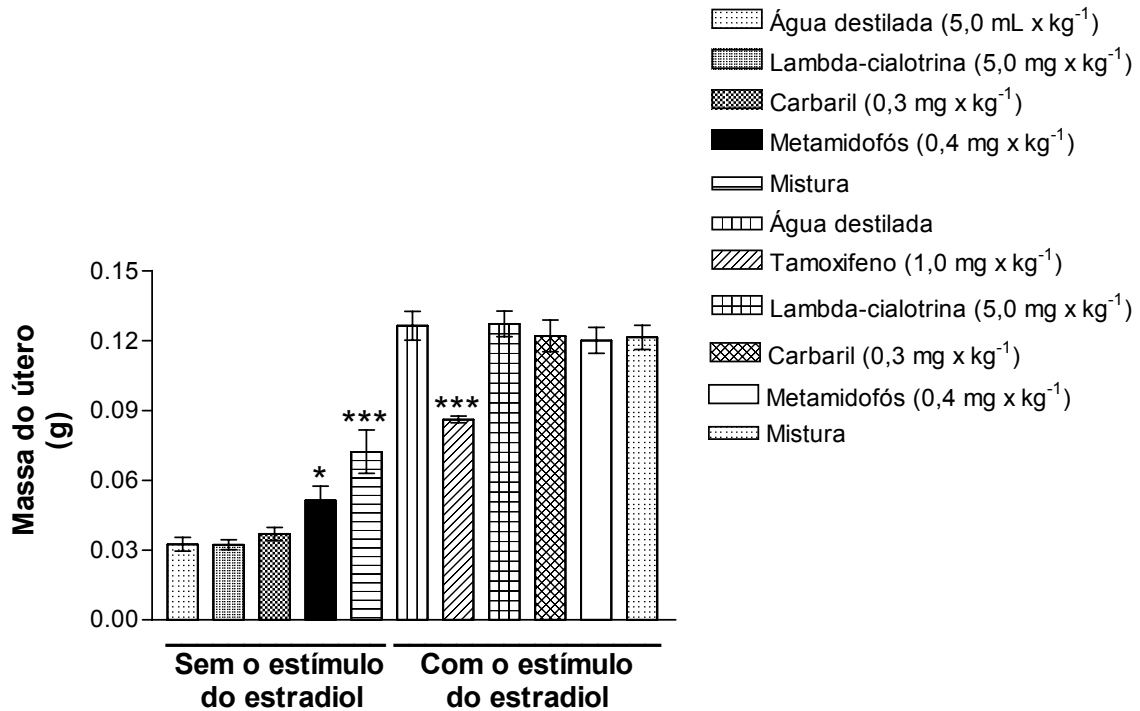
As ratas foram sacrificadas 24 horas após a última exposição (quarto dia).

O tamoxifeno foi utilizado como referência de uma substância com ação antiestrogênica.

A água destilada foi utilizada como referência para a ausência de ação estrogênica.

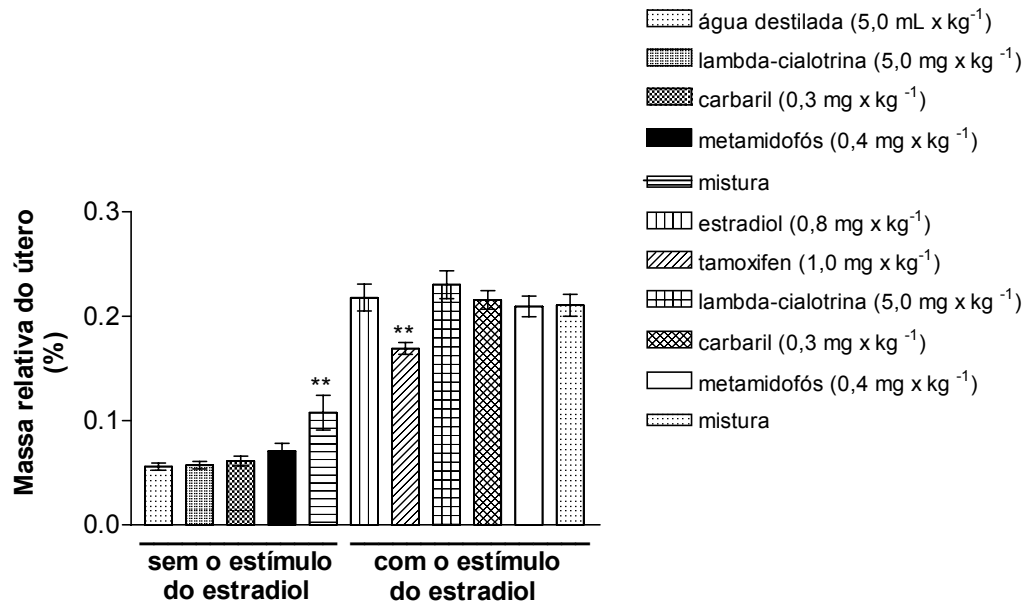
Os resultados representam as médias em gramas  $\pm$  erro padrão da média.

FIGURA 20 – MASSA ABSOLUTA DO ÚTERO DE RATAS IMATURAS EXPOSTAS A LAMBDA-CIALOTRINA, AO CARBARIL E AO METAMIDOFÓS AFERIDA NO SACRIFÍCIO - TESTE UTEROTRÓFICO



NOTAS: Massa absoluta do útero de ratas (21º dia pós-natal) expostas aos pesticidas isolados e misturados, com e sem o estímulo uterotrófico do estradiol. As ratas foram sacrificadas 24 horas após a última exposição (quarto dia). O tamoxifeno foi utilizado como referência de uma substância com ação antiestrogênica. A água destilada foi utilizada como referência para a ausência de ação estrogênica. Os resultados representam as médias em gramas  $\pm$  erro padrão da média. Difere significativamente do controle (\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*;  $p < 0,001$ ): ANOVA – Bonferroni.

FIGURA 21 – MASSA RELATIVA DO ÚTERO DE RATAS IMATURAS EXPOSTAS A LAMBDA-CIALOTRINA, AO CARBARIL E AO METAMIDOFÓS AFERIDA NO SACRIFÍCIO - TESTE UTEROTRÓFICO



NOTAS: Massa relativa do útero de ratas (21<sup>o</sup> dia pós-natal) expostas aos pesticidas isolados e misturados, com e sem o estímulo uterotrófico do estradiol.

As ratas foram sacrificadas 24 horas após a última exposição (quarto dia).

O tamoxifeno foi utilizado como referência de uma substância com ação antiestrogênica.

A água destilada foi utilizada como referência para a ausência de ação estrogênica.

Os resultados representam as médias em percentual  $\pm$  erro padrão da média.

Difere significativamente do controle (\*\*;  $p < 0,01$ ): ANOVA – Bonferroni.

## 6 DISCUSSÃO

A população ingere pesticidas na forma de resíduos encontrados nos alimentos *in natura* e processados. Além desse tipo de exposição também há a absorção de pesticidas através da pele. A população é exposta a essa forma de contaminação ao aplicar pesticidas nas residências e animais (TITCHENER, 1985; MUNZAVA e cols., 1993; CHARLWOOD e cols., 1995). Os trabalhadores rurais que realizam a diluição e as aplicações nas lavouras são os mais susceptíveis a essa exposição (LARSEN e cols., 1998). Essa fração da população frequentemente não toma cuidado com o destino das embalagens dos produtos e nem com a proteção individual.

A exposição aos pesticidas pode ocasionar intoxicação aguda, o que leva ao aparecimento de sinais clínicos como salivação, diarreia, tremor, vômito, convulsão, coma e morte (NPTN, 2001). A exposição crônica a baixas doses de pesticidas geralmente não é percebida, ou não se consegue correlacionar o período de exposição ao aparecimento do efeito. A exposição crônica a baixas doses pode levar à alteração reprodutiva, no sistema imune e ao aparecimento de neoplasias (COLBORN; VON SAAL; SOTO, 1993; US EPA, 1997; RHIND, 2002; SINGH; RISH, 2005). Para tentar correlacionar os efeitos adversos na reprodução humana (SHARPE, 1994; JENSEN e cols., 1995; TOPPARI e cols., 1996; US EPA, 1996) a exposição aos pesticidas são realizados testes de curta e longa duração em animais de laboratório (US EPA, 1997, 1998). Os testes de longa e curta duração são associados a testes *in vitro* para tentar desvendar o mecanismo de ação da substância. Os testes de longa duração são os que mais se assemelham as condições de exposição da população. Nestes testes os animais experimentais são expostos a baixas doses dos pesticidas pela via oral por um longo período e em períodos críticos, como o acasalamento, gestação e lactação. Com este modelo de exposição é possível investigar os possíveis efeitos adversos de pesticidas sobre organismos maduros e imaturos. Os protocolos de longa duração muitas vezes auxiliam na escolha de testes mais específicos para tentar desvendar o mecanismo de ação das substâncias.

A maioria dos pesticidas hoje comercializados no mundo não passou por testes de longa duração (exceto testes para detectar substâncias carcinogênicas) e não há dados que comprovem ou não a responsabilidade destas substâncias nos problemas reprodutivos humanos e animais frequentemente debatidos (SAFE, 2004). Os três pesticidas desse estudo são encontrados em alimentos na forma de resíduos e são utilizados no combate a pragas domiciliares e de animais domésticos. Poucos estudos demonstram interferência dessas substâncias na reprodução animal e humana (MATHUR; BHATNAGAR, 1991; MONIZ e cols, 1999; CASTRO; CHIORATO; PINTO, 2000; BURRUEL e cols., 2000). O propósito do estudo de longa duração foi de tentar detectar efeitos adversos dos pesticidas lambda-cialotrina, carbaril e metamidofós em variáveis reprodutivas de ratos Wistar expostos durante períodos críticos do desenvolvimento (gestação e lactação). O propósito do estudo de curta duração (teste uterotrófico) foi de tentar desvendar um possível mecanismo de ação dos pesticidas com base em resultados obtidos no teste de longa duração.

### **6.1 Dados da prenhez**

O baixo ganho de massa corporal em animais expostos a pesticidas é de grande utilidade para determinar a toxicidade de substâncias (CASTRO; CHIORATO; PINTO, 2000). A ausência de toxicidade materna nas doses testadas é demonstrada pelo ganho de massa corporal semelhante para todas as progenitoras expostas. Os resultados da prenhez (tempo de prenhez, número de implantes, número de filhotes nascidos, desmamados e viabilidade) confirmam a ausência de toxicidade materna. Além desses resultados, também não foram observados sinais clínicos de toxicidade como salivação, diarreia, tremores ou convulsões durante toda a exposição. Estes resultados indicam que as substâncias testadas não causam toxicidade materna em doses até 100 vezes superiores a IDA, confirmando a segurança de se estabelecer o limite máximo de resíduos permitido em uma cultura tomando como base a IDA (ANVISA, 2003b).

## 6.2 Dados do desenvolvimento geral dos descendentes

O desenvolvimento geral dos descendentes (ganho de massa, período para descolamento dos pavilhões auriculares e abertura de olhos) não foi afetado pelos pesticidas lambda-cialotrina, carbaril e metamidofós nas doses testadas. O ganho de massa dos animais em desenvolvimento pode ser afetado por pesticidas desreguladores endócrinos de duas maneiras. Através da intoxicação, levando ao baixo ganho de massa, ou por ação estrogênica, promovendo o aumento na liberação de hormônio do crescimento através da estimulação da hipófise (HAFEZ, 1995). O atraso para o surgimento de pêlos nos grupos expostos a lambda-cialotrina e ao metamidofós foi de apenas algumas horas, possivelmente devido ao limitado número de observações de partos (pela manhã e no final da tarde). Esses resultados são indicativos da ausência de toxicidade na progênie em desenvolvimento nas doses testadas.

## 6.3 Dados do desenvolvimento sexual dos descendentes fêmeas

A secreção de gonadotrofinas folículo-estimulante e luteinizante (FSH e LH) se iniciam na vida intrauterina e retornam aos níveis basais até puberdade, após a maturação do sistema nervoso central. Estes hormônios são responsáveis pelo estímulo para a produção de hormônios estrógenos pelos ovários. Os estrógenos são os responsáveis pelas características do desenvolvimento sexual (WILSON; GEORGE; GRIFFIN, 1981). A exposição da progênie feminina aos pesticidas *in utero* e na lactação não alterou o período médio (dias) para a abertura do canal vaginal, nem a regularidade do ciclo estral. A detecção do primeiro estro, porém, ocorreu tardiamente nos grupos expostos ao carbaril e a lambda-cialotrina. O retardo no primeiro estro poderia ser devido à ação antiestrogênica destes pesticidas. Como outros piretróides sintéticos foram testados em ensaios para detecção de (anti)estrogenicidade *in vitro* e apresentaram ação estrogênica (BAKER, 2001), resolvemos realizar um teste de curta duração (teste uterotrófico) para confirmar a possível ação (anti)estrogênica destes pesticidas. Neste teste o carbaril e a lambda-cialotrina não apresentaram ação (anti)estrogênica. Como o ensaio uterotrófico detecta apenas substâncias com ação direta no receptor para o hormônio estradiol, é possível que tenha ocorrido interferência de algum componente da fórmula em

outro local de regulação do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas no período de desenvolvimento dos animais.

#### **6.4 Progênie feminina em idade adulta**

O aumento da massa de órgãos responsáveis pelo metabolismo e eliminação de substâncias pode ser um sinal de indução enzimática (JONES; HUNT; KING, 2000) e o útero é um órgão que aumenta a massa em resposta a estímulos estrogênicos (SIEGMUNDO, 1979). Nessa pesquisa, a progênie feminina em idade adulta não apresentou alterações morfológicas macroscópicas nos órgãos. Essas observações associadas a ausência de interferência dos pesticidas na massa absoluta e relativa dos órgãos averiguados (fígado, rins e útero) indicam a ausência de efeitos tóxicos e reprodutivos permanentes dos pesticidas nas doses testadas.

#### **6.5 Desenvolvimento sexual dos descendentes masculino**

A exposição da progênie masculina aos pesticidas lambda-cialotrina, carbaril e metamidofós *in utero* e na lactação não alterou o período médio (dias) para a descida dos testículos à bolsa escrotal e para a separação prepucial. Estas variáveis são sinais externos do desenvolvimento sexual de ratos machos e dependem da secreção de andrógenos (WILSON; GEORGE; GRIFFIN, 1981). Estes resultados indicam que os pesticidas, nas doses testadas, não interferiram no desenvolvimento sexual intermediado por andrógenos.

#### **6.6 Progênie masculina em idade adulta**

Os pesticidas não influenciaram a massa absoluta e relativa das glândulas sexuais acessórias andrógeno-dependentes (próstata e vesícula seminal) dos descendentes masculinos adultos. Também não houve diferença na massa dos órgãos responsáveis pela detoxificação (fígado e rins). A massa dos testículos e epidídimos não foi diferente entre os grupos. Não houve interferência dos pesticidas na produção espermática diária, na concentração média de espermatozóides na cauda do epidídimo e no tempo de trânsito espermático. Os resultados do desenvolvimento sexual masculino associado aos observados no adulto reforçam a observação de que a IDA proposta pela ANVISA (2003b) é segura tanto para gestantes e lactantes, assim como para os fetos em desenvolvimento e para os



recém-nascidos, quando consideramos unicamente a exposição da progênie através da placenta e do leite materno.

### **6.7 Teste uterotrófico**

O inseticida piretróide lambda-cialotrina isolado não apresentou ação (anti)estrogenica nas dose testada. ANDRADE e cols. (2002) também não verificaram ação (anti)estrogênica para outro piretróide sintético (deltametrina) no ensaio uterotrófico. O grupo exposto ao carbaril isolado também não apresentou ação (anti)estrogênica no teste uterotrófico. Com esse resultado podemos supor que o retardo para a ocorrência do primeiro estro observado nas fêmeas em desenvolvimento pode ter sido decorrente da interferência do pesticida em outro local de regulação do eixo hipotálamo-hipófise-gonadas, e não diretamente como agonistas ou antagonistas do receptor para o hormônio estradiol.

De acordo com KANNO e cols. (2001) a massa relativa e absoluta são igualmente eficazes para detectar efeitos (anti)estrogênicos no teste uterotrófico. Em no nosso trabalho, o metamidofós ocasionou aumento da massa absoluta do útero sem o estímulo do estradiol, porém, esse aumento não foi confirmado quando analisada a massa relativa do útero. Novos testes devem ser realizados com diferentes concentrações do metamidofós para uma melhor caracterização estrogênica desse pesticida. O aumento na massa uterina na ausência do hormônio estradiol revela a propriedade estrogênica da substância por ação direta como agonista do receptor para o hormônio estradiol. A ação estrogênica direta de compostos organofosforados também foi observada em testes *in vitro* utilizando células MCF-7 (GRÜNFELD; BONEFELD-JORGENSEN, 2004; ANDERSEN e cols., 2002).

Como os pesticidas raramente são encontrados isolados em culturas (ANVISA, 2003a) a mistura dos pesticidas foi testada no ensaio uterotrófico. A mistura causou efeito estrogênico no teste uterotrófico, observado através do aumento na massa absoluta e relativa do útero. Este aumento não foi estatisticamente diferente do encontrado para o grupo exposto ao metamidofós. Assim, presumimos que o metamidofós seja o maior responsável pelo efeito estrogênico da mistura e que haja ação sinérgica com os outros pesticidas da mistura. Os inseticidas devem ser testados combinados dois a dois para verificar se

a ação sinérgica é exclusivamente do carbamato com o metamidofós ou se há interferência do piretróide lambda-cialotrina.

### **6.8 Comparação do teste de longa com o de curta duração**

A ação estrogênica do metamidofós observada no teste uterotrófico não foi reproduzida no teste de longa duração. Vários fatores podem ter contribuído para que a substância não tenha apresentado resultados (estrogenicidade) similares nos dois testes. No teste uterotrófico as ratas imaturas recebem o pesticida através de gavagem, enquanto no teste de longa duração a exposição é através da placenta e do leite materno, ou seja, as ratas recebem a substância já metabolizada pela mãe e em concentração menor que a mãe. Substâncias estrogênicas podem ter ação estimulatória ou inibitória no eixo hipotálamo-hipófise-gonadas, dependendo do período de desenvolvimento em que o animal foi exposto no teste de longa duração. O teste de longa duração também detecta desreguladores endócrinos que atuam por diferentes mecanismos, além da ação direta nos receptores de hormônios esteróides. Com isso, podemos dizer que o teste de longa duração é eficiente para detectar possíveis desreguladores endócrinos, enquanto o teste uterotrófico é eficiente para caracterizar substâncias como agonistas ou antagonista do receptor para o hormônio estradiol. Os dois testes devem ser realizados para determinarmos o risco de uma substância estar interferindo no sistema endócrino.

### **6.9 Riscos dos pesticidas**

O risco que estes contaminantes ambientais podem trazer para a saúde humana e animal só pode ser elucidado utilizando protocolos validados por agências reguladoras internacionais e pela comunidade científica. Apenas com estes estudos será possível retirar substâncias nocivas do mercado e conscientizar a população para o risco tóxico a que está submetida. Testes *in vitro* e *in vivo* de curta duração devem sempre ser associados a testes reprodutivos de longa duração para a adequada caracterização do potencial toxicológico do possível desregulador endócrino. Utilizando vários protocolos as substâncias são primeiramente rastreadas e posteriormente é possível elucidar o mecanismo de ação e indicar as possíveis injúrias que o sistema reprodutivo pode sofrer frente a determinados contaminantes químicos ambientais.

## 7 CONCLUSÕES

A exposição de ratas aos pesticidas lambda-cialotrina, carbaril e metamidofós durante a prenhez e a lactação não ocasionou toxicidade materna em doses 100 vezes superiores IDA.

O desenvolvimento geral e sexual da progênie masculina e feminina exposta *in utero* e na lactação aos pesticidas não foi afetado. Também não houve toxicidade geral ou sexual na progênie adulta.

A lambda-cialotrina e o carbaril não apresentaram efeito estrogênico no teste uterotrófico, porém quando associados ao metamidofós ocasionaram este efeito, demonstrando a ação de sinergismo entre os pesticidas.

Assim sendo, podemos concluir que protocolos de curta e longa duração devem ser realizados concomitantemente para detectar possíveis efeitos adversos de contaminantes ambientais sobre o sistema endócrino.

## REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA. **Resultados Analíticos de 2002 de pesticidas**. Brasília. 2003a.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Monografia de pesticidas, 2003. **Citação e referência a documentos eletrônicos**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 03 de novembro de 2003b.

ANDRADE, A. J. M. e cols. Screening for (anti)estrogenic and (anti)androgenic activities of technical and formulated deltamethrin. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 35, n. 3, p. 379-382, 2002.

ANDERSEN, H. R. e cols. Effects of Currently Used Pesticides in Assays for Estrogenicity, Androgenicity, and Aromatase Activity in Vitro. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 179, p. 1-12, 2002.

ANGERER, J.; RITTER, A. Determination of metabolites of pyrethroids in human urine using solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 695, p. 217 – 226, 1997.

ASHBY, J. e cols. Failure to confirm estrogenic activity for benzoic acid and clofibrate: Implications for lists of endocrine-disrupting chemicals. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 26, p. 96-101, 1997.

ASSOCIAZIONE AMBIENTE E LAVORO (AMBLAV). Scheda tratta dalla Banca dati SINTALEX 7.0, 2000. **Citação e referência a documentos eletrônicos**. Disponível em: <<http://www.amblav.it/Download/Lamba-cialotrina.pdf>> Acesso em: 25 de março de 2004.

AZIZ, M. H. e cols. Neurodevelopmental consequence of gestacional exposure (GD14-GD20) to low doses of deltamethrin in rats. **Neuroscience Letters**, v.300, n. 3 p.161-165, 2001.

BAKER, V. A. Endocrine disrupters - testing strategies to assess human hazard. **Toxicology in vitro**, v. 15, p. 413-419, 2001.

BURRUEL V. R. e cols. Paternal Effects from Methamidophos Administration in Mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 165, p. 148-157, 2000.

CALDAS, E. D.; SOUZA, L. C. Avaliação de risco crônico da ingestão de resíduos de pesticidas na dieta brasileira. **Revista de Saúde Pública**, v. 34, n. 5, p. 529-537, 2000.

CAGE, S. A.; e col. Lambda-cyhalothrin. **National Poisons Information Service**. Birmingham, UK, 1998.

CASTRO V. L.; CHIORATO S. H.; PINTO N. F. Relevance of developmental testing of exposure to methamidophos during gestation to its toxicology evaluation. **Toxicology Letters**, v. 118, p. 93-102, 2000.

ÇELIAK, A. e cols. Cytogenetic effects of lambda-cyhalothrin on Wistar rat bone marrow. **Mutation Research**, n. 539, p. 91-97, 2003.

CHARLWOOD, J. D. e cols. A field trial with Lambda-cyhalothrin (ICON) for the intradomiciliary control of malaria transmitted by *Anopheles darlingi* Root in Rondonia, Brazil. **Acta Tropica**, v. 60, p. 3-13, 1995.

COLBORN, T.; VOM-SAAL, F. S.; SOTO, A. M. Development effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. **Environmental Health Perspectives**, v. 101, p. 378-384, 1993.

COOPER, R. L.; GOLDMAN, J. M.; STOKER, T. E. Neuroendocrine and reproductive effects of contemporary-use pesticides. **Toxicology and Industrial Health**, v.15, p. 26-36, 1999.

COX, C. Carbaryl. **Journal of Pesticide Reform**, v.13, n 1, p. 31-16, 1993.

DI MUCCIO, A. e cols. Selective extraction of pyrethroid pesticide residues from milk by solid-matrix dispersion. **Journal of Chromatography A**, v. 765, p. 51-60, 1997.

DI MUCCIO, A. e cols. Determination of pyrethroid pesticide residues in fatty materials by solid-matrix dispersion partition, followed by mini-column size exclusion chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 833, p. 19-34, 1999.

ECOBICHON, D. J. Toxic effects of pesticides. In: KLAASSEN, C. D. **Casarett & Doull's Toxicology. The basic science of poisons**. New York: McGraw-Hill, 1996. p. 643-689.

ENDOCRINE DISRUPTOR SCREENING AND TESTING ADVISORY COMMITTEE (EDSTAC). **EPA/743/R-98/003**: Final Report. Washington, 1998.

ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA. Cyhalothrin. **International Programme on Chemical Safety**. Genebraa, Suíça, 1999.

GHEKIERE, A. e cols. Purification and characterization of vitellin from the estuarine mysid *Neomysis integer* (Crustacea; Mysidacea). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A, v. 138, p. 427-433, 2004.

GO, V. e cols. Estrogenic potential of certain pyrethroid compounds in the MCF-7 human breast carcinoma cell line. **Environmental Health Perspectives**, v. 107, n. 3, p. 173-177, 1999.

GÖETTLICH, P. What are Endocrine Disruptors?, 2003. **Citação e referência a documento eletrônico**. Disponível em: <<http://www.mindfully.org/Pesticide/EDs-PWG-16jun01.htm>> Acesso em: 23 de dezembro de 2003.

GRAY, L. E. e cols. Xenoendocrine disrupters-tiered screening and testing. **Toxicology**, v. 27, p. 371-382, 2002.

GRÜNFELD, H. T.; BONEFELD-JORGENSEN, E. C. Effect of in vitro estrogenic pesticides on human oestrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  mRNA levels. **Toxicology Letters**, v. 151, p. 467-480, 2004.

HAFEZ E. S. E., ed. **Reprodução animal**. São Paulo: Manole, 1995.

HARADA, N.; HONDA, S. Analysis of spatiotemporal regulation of aromatase in the brain using transgenic mice. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, 2005, *in press*.

HERSHBERGER, L.; SHIPLEY, E.; MEYER, R. Myotrophic activity of 19-nortestosterone and other steroids determined by modified levator and muscle method. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 83, p. 175-180, 1953.

HIRSCH K. S. e cols. Inhibition of central nervous system aromatase activity: a mechanism for fenarimol-induced infertility in the male rat. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 91, p. 235-245, 1987.

HOF, A.; HEIMANN, D.; RÖMBKE, J. Further development for testing the effects of pesticides on wolf spiders. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 31, p. 267 – 270, 1995.

INGBAR, S. H.; WOEBER K. A. The thyroid gland. In: WILLIAMS R. H. **Textbook of Endocrinology**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1974. p. 95-232.

JENSEN, T. K. e cols. Do environmental estrogens contribute to the decline in male reproductive health? **Clinical Chemistry**, v. 41, n. 12, p.1896-1901, 1995.

JENSEN E. V.; KHAN S. A. A two-site model for antiestrogen action. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 125, p. 679–682, 2004.

JIMÉNEZ, B. Environmental effects of endocrine disruptors and current methodologies for assessing wildlife health effects. **Trends in Analytical Chemistry**, vol. 16, no. 10, p. 596-606, 1997.

JONES,T.C.; HUNT, R.D. e KING, N.W. **Patologia veterinária**. Ed. Manole, 6a ed., São Paulo, 2000.

JORDAN, V. C.; MURPHY, C. S. Endocrine pharmacology of antiestrogens as antitumor agents. **Endocr. Rev.**, v. 11, p. 578-610, 1990.

KANG, K. S. e cols. Immature uterotrophic assay is more sensitive than ovariectomized uterotrophic assay for the detection of estrogenicity of p-nonylphenol in Sprange-Dawley rats. **Toxicology Letters**, v. 118, p. 109-115, 2000.

KANNO, J. e cols. The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay to Screen Compounds for in Vivo Estrogenic Responses: Phase 1. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, p. 785-794, 2001.

LABRIE, F. e cols. EM-652 (SCH 57068), a third generation SERM acting as pure antiestrogen in the mammary gland and endometrium. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 69, p. 51-84, 1999.

LARSEN, S. B. e cols. A longitudinal study of semen quality in pesticide spraying danish farmers. **Reproductive Toxicology**, v. 12, n. 6, p. 581-589, 1998.

MACIOROWSKI, A. F. In the United States court of appeals for the ninth circuit. **Case No. 99-71143**, 1999. Executed on December 21, in Washington, D.C.

MACLUSKY, N. J.; NAFTOLIN, F. Sexual differentiation of the central nervous system. **Science**, v. 211, p. 1294-1303, 1981.

MARTY, M. S.; CRISSMAN, J. W. CARNEY, E.W. Evaluation of the EDSTAC female pubertal assay in CD rats using 17 $\beta$ -estradiol, steroid biosynthesis inhibitors, and a thyroid inhibitor. **Toxicological Sciences**, v. 52, p. 269-277, 1999.

MARTY, M. S.; CRISSMAN, J. W.; CARNEY, E.W. Evaluation of the male pubertal onset assay to detect testosterone and steroid biosynthesis inhibitors in CD rats. **Toxicological Science**, v. 60, p. 285-295, 2001.

MATHUR, A.; BHATNAGAR. P. A teratogenic study of carbaryl in Swiss albino mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 29, n. 9, p. 629-632, 1991.

MONIZ, A. C. e cols. Perinatal fenvalerate exposure: behavioral and endocrinology changes in male rats. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 21, n. 5, p. 611-618, 1999.

MUNZAVA, A. E. P. e cols. The effects of house spraying with DDT or lambdacyhalothrin against Anopheles arabiensis on measures of malarial morbidity in children in Tanzania. **Acta Tropica**, v. 54, p. 141-151, 1993.

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES (NAS). Hormonally Active Agents in the Environment. **National Academy Press**, Washington, DC. 1999.

NATIONAL PESTICIDE TELECOMMUNICATIONS NETWORK (NPTN). Lambda-cyhalothrin. **Technical Fact Sheet**. Corvallis, Oregon, 2001.

NEUBERT, D.; CHAHOUD, I. Possible consequences of pre- or early postnatal exposure to substances with estrogenic or androgenic properties. **Endocrin. Chemic. Environ**, v.3, p. 24-52, 1995.

ODUM, J. e cols. The rodent uterotrophic assay: Critical protocol features, studies with phenols, and comparison with a yeast estrogenicity assay. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 25, p. 176-188, 1997.

OENGA, N. G.; SPINK, D. C.; CARPENTER, D. O. TCDD and PCBs inhibit breast cancer cell proliferation in vitro. **Toxicology in Vitro**, v. 18, p. 811-819, 2004.

PEREIRA, O. C. M. Endocrine disruptor and hypothalamic sexual differentiation. **ARBS Annu. Rev. Biomed. Sci.**, v. 5, p. 87-94, 2003.

PESTICIDE ACTION NETWORK – UK (PAN-UK). A catalogue of lists of pesticides identifying those associated with particularly harmful health or environmental impacts. **Briefing Paper List of Lists**. Reino Unido. 2001.

PESTICIDE FACT SHEET (PFS). Carbaryl. **Information Ventures**, 2004

PIZZAIA JUNIOR. Pesticidas agrotóxicos aptos no Paraná. **Secretaria de Estado da Agricultura e do abastecimento**. Curitiba, Paraná, 2003.

RAMESH, A. e RAVI, P.E. Electron ionization gas chromatography – mass spectrometric determination of residues of thirteen pyrethroid insecticides in whole blood. **Journal of Chromatography B**, n. 802, p. 371–376, 2004.

RATNASOORYA, W. D.; RATNAYAKE, S. S. K. e JAYATUNGA, Y. N. A. Effects of pyrethroid insecticide ICON (lambda cyhalothrin) on reproductive competence of male rats. **Asian Journal of Andrology**, v. 4, p. 35-41, 2002.

RHIND, S. M. Endocrine disrupting compounds and farm animals: their properties, actions and routes of exposure. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, p. 179-187, 2002.

SAFE, S. Endocrine disruptors and human health: is there a problem. **Toxicology**, v. 205, p. 3-10, 2004.

SCHNEIDER, S. e cols. Octyl methoxycinnamate: Two generation reproduction toxicity in Wistar rats by dietary administration. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 1083-1092, 2005.

SHEETS, L. P. e cols. Age-dependent differences in the susceptibility of rats to deltamethrin. **Toxicology. Applied Pharmacology**, v.126, p.186-190, 1994.

SIEGMUNDO O. H. ed **Merck Veterinary Manual**. Merck Research Laboratories, 5ª edição, New Jersey, 1979. p. 1042-1043.



SINGH, M.; RISHI, S. Plasma acetylcholinesterase as a biomarker of triazophos neurotoxicity in young and adult rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v, 19, p. 471-476, 2005.

SHARPE, R. M. Could environmental, oestrogenic chemicals be responsible for some disorders of the human male reproductive development ? **Current Opinion in Urology**, v. 4, p. 295-301, 1994.

SOTO, A. M. e cols. The E-SCREENING assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. **Environmental Health Perspectives**, v.103, p. 113-122, 1995.

STANDEVEN, A. M.; BLAZER III, D. G.; GOLDSWORTHY, T. L. Investigation of antiestrogenic properties of unleaded gasoline in female mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 127, p. 233-240, 1994.

SYNGENTA. Lambda-cyhalothrin, 2004. **Citação e referência a documento eletrônico.** Disponível em: <<http://www.bugspray.com/catalog/products/page162b.html>> Acesso em: 23 de março de 2004.

TITCHENER, R. N. The control of lice on domestic livestock. **Veterinary Parasitology**, v. 18, p. 281-288, 1985.

TOPPARI, J. e cols. Male reproductive health and environmental xenoestrogens. **Environmetal Health Perspectives**, v. 104, n. 4, p. 741-803, 1996.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US EPA). **EPA/630/R-96/009**: Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment. Washington, 1996.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US EPA). **EPA/630/R-96/012**: Special Report on Environmental Endocrine Disruption: An Effects Assessment and Analysis. Washington, 1997.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US EPA). **EPA/600/R-98/087**: Research Plan for Endocrine Disruptors, Washington. 1998.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US EPA). Endocrine Disruptor Screening Program, Washington. 2000a.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US EPA). Human health risk assessment: methamidophos, Washington. 2000b.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US EPA). IRIS Database for Risk Assessment. **Citação e referência a documento eletrônico.** Disponível em: <<http://www.epa.gov/iris/index.html>> Acesso em: 23 de março de 2004.

WILSON J. D., GEORGE F. W., GRIFFIN J. E. The hormonal control of sexual development. **Science**, v. 211, p. 1278-1284, 1981.

WITORSCH R. J. Endocrine Disruptors: Can Biological Effects and Environmental Risks Be Predicted? **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 36, p. 118–130, 2002.

WOODS, H. F. Organophosphates. **Committee on Toxicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment**. 1999.

WOOLLEN B. H., MARSH J. R., CHESTER G. Metabolite profiles of a pyrethroid insecticide following oral and dermal absorption in man. **Proceedings of a Conference on Percutaneous Penetration**, P. 10-12, 1991.

WOOLLEN B. H.; MARSH J. R.; LAIRD W. J. D.; LESSER J. E. The metabolism of cypermethrin in man: differences in urinary metabolite profiles following oral and dermal administration. **Xenobiotica**, v. 22, P. 983-991, 1992.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Toxicological evaluation of certain food additives with a review of general principles and of specifications. **Seventh report**, 539, WHO, Geneva, 1974.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **WHO/PCS/98.21**: The WHO recommended classification of pesticides by hazard, WHO, Geneva, 2002.